

Thèse

**MICROBIOCAPTEURS CONDUCTIMETRIQUES
UTILISANT DES OXYDOREDUCTASES
De la conception à l'application à l'environnement et
l'agroalimentaire**

Présentée et soutenue publiquement par

ThanhThuy NGUYEN BOISSE

le 02 Juillet 2013

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole doctorale : **Ecole Doctorale de Chimie de Lyon**

Spécialité : **Chimie**

Membres du jury :

Mme KORRI-YOUSSOUFI Hafsa	Rapporteur	Chargée de recherche CNRS, Orsay
M. PERROT Hubert	Rapporteur	Directeur de recherche CNRS, Paris
M. LEONARD Didier	Examineur	Professeur, Université Claude Bernard, Lyon
M. VOCANSON Francis	Examineur	Professeur, Université Jean Monnet, St Etienne
Mme LAGARDE Florence	Directrice de thèse	Chargée de recherche CNRS, Lyon
Mme JAFFREZIC-RENAULT Nicole	Co-directrice de thèse	Directeur de recherche CNRS, Lyon

Membres invités :

Mme DURRIEU Claude, Enseignant-chercheur, ENTPE, Vaux-en-Velin
Mme SAULNIER Joelle, Maître de conférences, UCBL, Lyon

Résumé :

Les biocapteurs sont des moyens d'analyse en plein essor à la fois rapides, sélectifs et peu coûteux applicables à des domaines extrêmement variés (environnement, santé, agroalimentaire,...). Dans ce type d'outil, un élément sensible de nature biologique (anticorps, enzyme, microorganisme, ADN...) doté d'un pouvoir de reconnaissance pour un analyte ou un groupe d'analytes est associé à un transducteur pouvant être de type électrochimique, optique ou thermique.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au développement de trois biocapteurs utilisant des enzymes de la famille des oxydo-réductases (alcool oxydase, lactate oxydase et formaldéhyde déshydrogénase) pour la détection d'analytes d'intérêt dans le domaine de l'agroalimentaire ou de l'environnement (alcools, lactate et formaldéhyde). Les trois enzymes ont été immobilisées sur des microélectrodes interdigitées en or en vue d'une détection conductimétrique. Nous avons cherché à mieux comprendre le fonctionnement des biocapteurs et optimisé le procédé d'immobilisation des enzymes ainsi que différents paramètres de fabrication ou de mesure afin de maximiser les performances analytiques des outils développés (sélectivité, limite de détection, reproductibilité, stabilité). Nous avons également démontré les potentialités d'application des deux biocapteurs conductimétriques à base de lactate oxydase et de formaldéhyde déshydrogénase pour la détection du lactate dans les produits laitiers et du formaldéhyde dans les eaux.

Mots-clés : Biocapteurs, conductimétrie, alcool oxydase, lactate oxydase, formaldéhyde deshydrogénase.

Abstract :

Biosensors are rapid, selective and inexpensive devices that combine a biological recognition element, the so-called bioreceptor (e.g. enzymes, antibodies, DNA or microorganisms) to a physical transducer (e.g. electrochemical, optical, thermal or piezoelectrical). They can be used to detect one specific analyte or one family of analytes for a wide range of applications (e.g. environment, food, health).

In this work, we developed biosensors based on three oxidoreductases (alcohol oxidase, lactate oxidase and formaldehyde dehydrogenase) for primary alcohols, lactate and formaldehyde analysis. The three enzymes were immobilized on interdigitated gold microelectrodes in view of conductometric detection. We tried to achieve a better understanding of biosensors processing and optimized enzyme immobilization as well as several fabrication or operational parameters to maximize analytical performances (selectivity, detection limit, reproducibility and stability). We also demonstrated the applicability of both conductometric biosensors based on lactate oxidase and formaldehyde dehydrogenase for the detection of lactate in dairy products and formaldehyde in waters.

Keywords: Biosensors, conductometry, alcohol oxidase, lactate oxidase, formaldehyde dehydrogenase

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au sein de l'Institut des Sciences Analytiques de Lyon. Pour arriver à ces résultats, j'ai bien sûr dû faire face à des moments de découragement, de questionnement et de doutes. Mais ce ne sont que de brefs souvenirs comparés à ceux que je garderai de la joie procurée par les manipulations, les discussions scientifiques et les moments partagés avec les permanents et non permanents du laboratoire.

Les jours sont fades sans la présence de merveilleuses personnes.

Je souhaiterais donc tout d'abord exprimer ma sincère reconnaissance à Mme **Florence Lagarde** et Mme **Nicole Jaffrezic-Renault**. J'ai vraiment apprécié et je n'oublierai jamais leur dévouement, la confiance et la sympathie qu'elles m'ont témoignées au cours de ces trois années de thèse. Je remercie Mme **Florence Lagarde** pour sa présence, son écoute, ses conseils et sa gentillesse qui m'a accompagnée avec entrain et bienveillance dans le joyeux monde des biocapteurs. Un grand merci également à ma co-directrice de thèse, Mme **Nicole Jaffrezic-Renault** dont l'aide, l'expérience précieuse et la bonne humeur m'ont été indispensables sur le plan scientifique ainsi que sur le plan humain. Son optimisme communicatif me manquera sûrement.

Merci à **M. Didier Léonard**, professeur à l'université Claude Bernard de Lyon et directeur de l'équipe SIMS (Surfaces-(bio)Interfaces-Micro/nanoSystèmes), pour m'avoir accueillie dans son groupe de recherche. Je dois dire que j'ai vraiment beaucoup apprécié son amabilité et également ses très bons chocolats.

Je tiens également à exprimer mes remerciements aux autres membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci à **Mme KORRI-YOUSSOUFI** et **M. PERROT** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse et d'avoir consacré du temps à la lecture de ce manuscrit. Je remercie aussi **Mme DURRIEU** pour m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres, *les permanents ou non permanents*, des deux équipes **SIMS** et **TechSep** pour tous les moments partagés avec vous dans la joie et la

bonne humeur. C'est un très grand privilège pour moi durant ces trois années d'avoir eu le sentiment d'appartenir, non pas à une seule équipe, mais à ces deux formidables équipes.

Je tiens également à exprimer ma gratitude aux membres du Laboratoire d'Electronique Biomoléculaire de l'Institut de Biologie Moléculaire et Génétique (Kiev, Ukraine), en particulier **M. Seirgei V. Dzyadevych**, pour avoir m'accueillie chaleureusement au sein de son équipe et son pays.

Je ne peux pas non plus oublier **Mme Joëlle Saulnier**, pour les expériences réalisées, nos discussions ainsi que les corrections de mon manuscrit, malgré son emploi du temps surchargé. C'est grâce à elle que j'ai réussi à mieux comprendre certains points dans le vaste monde de l'enzymologie, une terre qui jusqu'à là m'était inconnue.

Ma reconnaissance va également à la **Direction Générale de l'Armement (DGA)** et au **Projet Européen FP-7-PEOPLE-IRSES-2008 «NANOBIOSSENS»** pour avoir financé cette thèse.

Je tiens enfin à remercier les amis thésards ou non qui m'ont aidée au cours de ces trois ans de thèse. Les membres d'or de la confrérie (Lolo, Antho, Yo, Naz, Joseph, Racha et Gwen), merci à vous d'avoir rendu ces trois années inoubliables. Merci à Lolo et Antho pour vos folies, vos blagues et vos passions Coca Cola, à Yo pour ta gentillesse incomparable et les très bons Mont d'Or et la Cancoillotte, à Naz pour ta passion dans tout ce que tu entreprends et ton couscous à la suite géométrique, à Joseph pour la découverte de Berthom, à Gwen pour notre affection commune de la Normandie et à Racha pour ton sourire permanent et tes plats libanais plus que succulents.

Un grand merci également à Sophie, Peter et le petit Pierre pour toutes les joies et les moments que vous m'avez permis de partager.

Je n'oublie pas non plus Maggy pour son extrême gentillesse et sa disponibilité permanente.

Bien entendu, je remercie également tous les autres thésards ou stagiaires, présents ou passés, du laboratoire qui ont permis de travailler dans une ambiance toujours sympathique : Emilie, Amina, Fatma, Elena, Mohamed, Micky, Abdellatif, Olga, ZhenZhong, Amel, Micale, Nadège, Gabriel, Audrey, Josiane, Elodie, Sarra, Alice, Mouna. Je n'oublie pas non plus tous ceux que je n'ai pas cités ici et qui se reconnaîtront.

Finalement, un grand merci à toute ma grande famille « NGUYEN », ma belle famille et également la famille « Vo », en particulier à Coco et bac Yen, mes tantes et oncle à travers le monde, ou chi Anh, Bello, Mouna, Auré, mon « cousin » Hoang et ma « sweet little » sœur. Votre aide, votre présence et votre affection inconditionnelle sont pour moi ce qu'il y a de plus précieux au monde.

Et une pensée plus spéciale à mon père, ma mère et Ju Parce que je n'ai pas suffisamment de mots pour décrire votre importance pour moi.

« Và cuối cùng một suy nghĩ sâu sắc nhất dành cho cha tôi, mẹ tôi và Ju Bởi vì tôi không có đủ từ để mô tả tầm quan trọng của họ đối với cuộc sống của tôi. »

SOMMAIRE

Sommaire	I
Liste des figures	VII
Liste des tableaux	XIII
Liste des abréviations	XV
Introduction générale.....	1
Chapitre I : Etude bibliographique.....	3
I.1 Définition et fonctionnement des biocapteurs.....	3
I.1.1 Histoire des biocapteurs.....	3
I.1.2 Généralités sur les biocapteurs.....	4
I.1.2.1 Définition et fonctionnement général du biocapteur.....	4
I.1.2.2 Qualités métrologiques du biocapteur.....	5
I.1.3 Classification des biocapteurs.....	5
I.1.3.1 Classification selon la nature des biorécepteurs.....	5
I.1.3.2 Classification par le mode de détection.....	10
I.2 Les transducteurs électrochimiques.....	29
I.2.1 Généralités et nouvelles tendances.....	29
I.2.2. Les microélectrodes interdigitées.....	31
I.2.3. Modèle de circuit équivalent des électrodes interdigitées avec biomembrane.....	32
I.3 Enzyme.....	34
I.3.1. Définition d'une enzyme.....	34
I.3.2. Histoire de l'enzymologie.....	34
I.3.3 Nomenclature et classification des enzymes.....	36
I.3.4 Structures et mécanismes.....	37
I.3.4.1 Structure générale.....	37
I.3.4.2 Site actif.....	40
I.3.4.3 Mécanismes d'interaction.....	42
I.3.4.4 Spécificité.....	43
I.3.4.5 Cofacteurs.....	44
I.3.5 Cinétique enzymatique.....	46
I.3.5.1 Modèle de Michaelis-Menten.....	47

I.3.5.2 Effet coopératif – Equation de Hill.....	51
I.3.5.3 Facteurs influençant l'activité d'une enzyme libre	52
I.3.6 Quelques exemples d'enzyme.....	55
I.3.6.1 Formaldéhyde déshydrogénase.....	55
I.3.6.2 Alcool oxydase.....	57
I.3.6.3 Lactate oxydase.....	59
I.3.6.4 Peroxydase de raifort (Horseradish peroxidase HRP).....	61
I.4 Utilisation d'enzyme dans le développement des biocapteurs.....	63
I.4.1 Immobilisation des enzymes.....	65
I.4.1.1 Méthodes physiques d'immobilisation.....	66
I.4.1.2 Méthodes chimiques d'immobilisation.....	69
I.4.1.3 Ajout de nanomatériaux.....	73
I.4.2 Influence de l'immobilisation sur les propriétés de l'enzyme.....	74
I.4.2.1 Nature de l'enzyme.....	75
I.4.2.2 Nature du matériau composant le transducteur ou la matrice d'immobilisation	76
Références.....	78
Chapitre II : Optimisation d'un biocapteur enzymatique pour la détection conductimétrique des alcools aliphatiques à chaîne courte – Vers une meilleure compréhension des paramètres clefs influant les performances du biocapteur.....	93
II.1 Introduction.....	93
II.1.1 Généralités sur le méthanol et l'éthanol.....	93
II.1.2 Métabolisme et toxicité des deux alcools.....	95
II.1.2.1 Méthanol.....	95
II.1.2.2 Ethanol.....	97
II.1.3 Biocapteurs enzymatiques pour la détection des alcools.....	98
II.2 Matériels et méthodes.....	100
II.2.1 Réactifs.....	100
II.2.2 Détermination de l'activité des différentes alcool oxydases.....	100
II.2.3 Transducteurs.....	101
II.2.4 Préparation des biocapteurs.....	102
II.2.5 Mesures conductimétriques.....	103
II.3 Résultats et discussion.....	104
II.3.1 Choix du transducteur.....	104
II.3.1.1 Evaluation de la réponse des capteurs nus.....	105

II.3.1.2 Tests en présence d'enzyme.....	106
II.3.2 Choix de la souche de provenance de l'alcool oxydase.....	107
II.3.2.1 Mesure de l'activité enzymatique des trois enzymes libres.....	107
II.3.2.2 Mesure des activités catalytiques et des affinités pour le méthanol des enzymes immobilisées sur la surface sensible du transducteur.....	108
II.3.3 Stabilité des solutions enzymatiques.....	110
II.3.4 Influence de la composition de la membrane enzymatique sur la réponse du biocapteur.	111
II.3.4.1 Ajout de nanoparticules d'or.....	111
II.3.4.2 Ajout de HRP.....	112
II.3.4.3 Quantité d'alcool oxydase.....	114
II.3.4.4 Quantité de BSA.....	116
II.3.4.5 Temps de réticulation.....	116
II.3.5 Influence de la composition de l'électrolyte de mesure.....	117
II.3.5.1 Influence du pH du milieu.....	117
II.3.5.2 Influence de la concentration en tampon.....	118
II.3.6 Caractéristiques analytiques du biocapteur AOX/HRP.....	119
II.4. Conclusion.....	121
Références.....	122
Chapitre III : Développement d'un biocapteur conductimétrique sensible pour la détermination de la concentration en lactate total, en D et en L-Lactate dans les produits laitiers	
III.1 Introduction.....	125
III.1.1 Généralités sur le lactate.....	125
III.1.2 Biocapteurs enzymatiques pour la détermination du lactate.....	127
III.2 Matériels et méthodes.....	129
III.2.1 Réactifs et solutions.....	129
III.2.2 Préparation des biocapteurs.....	129
III.2.3 Mesures conductimétriques.....	130
III.2.4. Mesure spectrophotométrique de la sélectivité de la LODP vis-à-vis du L-lactate	130
III.2.5 Préparation et analyse des échantillons de yaourt.....	131
III.3 Résultats et discussion.....	131
III.3.1 Influence de la quantité de HRP et du pH sur la détection du L-lactate.....	131
III.3.1.1 Quantité de HRP.....	131
III.3.1.2 pH du milieu.....	133
III.3.2 Influence du temps de réticulation sur la réponse du biocapteur bienzymatique LODP/HRP	134

III.3.3 Réponse des biocapteurs LODP et LODP/HRP vis-à-vis du D-lactate.....	135
III.3.4 Caractéristiques analytiques des biocapteurs LODP et LODP/HRP.....	137
III.3.4.1 Gamme linéaire et limite de détection.....	137
III.3.4.2 Reproductibilité intra-capteur à court terme.....	137
III.3.4.3 Stabilité.....	137
III.3.4.4 Sélectivité.....	139
III.3.5 Effet de matrice.....	140
III.3.6 Détermination des concentrations en lactate total, D-et L-lactate dans les échantillons de yaourt.....	143
III.3.6.1 Calcul de la concentration totale en lactate.....	143
III.3.6.2 Calcul des concentrations en D-et L-lactate.....	143
III.3.6.2 Résultats.....	144
III.4. Conclusion.....	145
Références.....	146
Chapitre IV : Développement d'un biocapteur pour l'analyse du formaldéhyde en milieu aqueux	
IV.1 Introduction.....	149
IV.1.1 Généralités sur le formaldéhyde.....	149
IV.1.2 Sources et toxicité du formaldéhyde.....	150
IV.1.3 Biocapteurs électrochimiques pour la détection du formaldéhyde.....	151
IV.2. Matériels et méthodes.....	153
IV.2.1 Réactifs.....	153
IV.2.2 Préparation des solutions.....	153
IV.2.3 Construction du biocapteur.....	154
IV.2.3.1 Sans nanoparticules d'or	154
IV.2.3.2 Avec nanoparticules d'or.....	155
IV.2.4 Mesures électrochimiques.....	155
IV.2.5 Mesures des paramètres cinétiques de la pFDH par la méthode du pH-stat.....	156
IV.3. Résultats et discussion.....	156
IV.3.1 Choix de la méthode d'immobilisation.....	156
IV.3.1.1 Résultats en absence de nanoparticules d'or.....	157
IV.3.1.2 Résultats en présence de nanoparticules d'or.....	158
IV.3.2 Optimisation des paramètres liés à l'enzyme et à son cofacteur.....	159
IV.3.2.1 Quantité d'enzyme.....	159
IV.3.2.2 Paramètres liés au cofacteur.....	160
IV.3.3 Optimisation des paramètres d'immobilisation.....	160

IV.3.3.1 Paramètres de réticulation de la membrane enzymatique.....	160
IV.3.3.2 Optimisation de l'épaisseur de la membrane de Nafion.....	161
IV.3.4 Optimisation des paramètres de mesure.....	163
IV.3.4.1 Pouvoir tampon et force ionique.....	163
IV.3.4.2 pH.....	165
IV.3.5 Caractéristiques analytiques du biocapteur conductimétrique.....	165
IV.3.6 Application à des échantillons réels.....	168
IV.4. Conclusion.....	173
Références.....	174
Conclusions et perspectives	179
Annexe : liste des publications et communications	185

Liste des figures

Fig.I.1 :	Schéma de principe de fonctionnement d'un biocapteur.....	4
Fig.I.2 :	Structure schématique du récepteur membranaire olfactif.....	6
Fig.I.3 :	Schéma de principe de l'interaction Ac-Ag.....	7
Fig.I.4 :	Structure schématique et composition de l'ADN.....	8
Fig.I.5 :	Image microscopique de <i>Pseudomonas putida</i>	9
Fig.I.6 :	Schéma de la structure de la glucose oxydase extraite d'une moisissure de genre <i>Penicillium</i>	10
Fig.I.7 :	Cristal de quartz piézoélectrique.....	11
Fig.I.8 :	Composition d'une fibre optique.....	13
Fig.I.9 :	Principe d'un interféromètre Mach-Zehnder.....	14
Fig.I.10 :	Schéma de principe de la détection SPR.....	14
Fig.I.11 :	Réponse typique d'un capteur SPR (suivi de l'angle de résonance en fonction du temps).....	15
Fig.I.12 :	Schéma de principe de la potentiométrie.....	17
Fig.I.13 :	Schéma de principe de la voltammétrie.....	18
Fig.I.14 :	Schéma de principe d'un biocapteur enzymatique ampérométrique en présence d'un médiateur en solution (a) et co-immobilisé avec l'enzyme sur l'électrode (b).....	19
Fig.I.15 :	Schéma de principe de l'impédancemétrie.....	20
Fig.I.16 :	Différents processus électrochimiques à l'interface métal/électrolyte.....	21
Fig.I.17 :	Diagramme de Bode.....	21
Fig.I.18 :	Représentation de Nyquist.....	21
Fig.I.19 :	Circuit électrique de Randles.....	23
Fig.I.20 :	Calcul des différents composants du circuit de Randles à partir du diagramme de Nyquist.....	24
Fig.I.21 :	Schéma de principe de la conductimétrie.....	25
Fig.I.22 :	Structure en bandes parallèles des électrodes interdigitées	31
Fig.I.23 :	Illustration du procédé de recyclage des espèces redox des électrodes interdigitées.....	31
Fig.I.24 :	Modèle de circuit équivalent au transducteur conductimétrique à deux électrodes interdigitées utilisé dans ce travail.....	32
Fig.I.25 :	Modèle de circuit simplifié équivalent (sans impédance de Warburg) au transducteur conductimétrique à deux électrodes interdigitées utilisé dans ce travail.....	33
Fig.I.26 :	Le modèle clef-serrure du complexe enzyme – substrat.....	35
Fig.I.27 :	Structure tertiaire de l'alcool déshydrogénase extraite du foie de cheval.....	38
Fig.I.28 :	Comparaison entre la taille du substrat, du site actif et de l'enzyme.....	40
Fig.I.29 :	Comparaison du niveau d'énergie requis pour 2 réactions dont l'une est catalysée par une enzyme et l'autre pas.....	42
Fig.I.30 :	Deux modes de fonctionnement du site actif – (a) : mode complémentaire : clé – serrure et (b) : mode induit.....	44

Fig.I.31 :	Structure chimique du coenzyme flavine adénine dinucléotide (FAD).....	45
Fig.I.32 :	Structure chimique du coenzyme NAD^+	45
Fig.I.33 :	Evolution de la concentration des espèces réagissantes pour $k_{+1} \sim k_{-1} \sim k_{+2}$	48
Fig.I.34 :	Représentation graphique d'une cinétique michaelienne. Evolution de la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat.....	49
Fig.I.35 :	Représentation graphique de la linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten, A : représentation de Lineweaver-Burk et B : représentation de Eadie-Hosfte.....	50
Fig.I.36 :	Effet de la température sur la vitesse d'une réaction chimique (A), sur la dénaturation d'une enzyme (B) et sur l'activité globale d'une enzyme.(C).....	53
Fig.I.37 :	Effet du pH sur les équilibres mis en jeu dans la réaction enzymatique.....	53
Fig.I.38 :	Comparaison de l'effet du pH sur l'amylase et la monoamine oxydase.....	54
Fig.I.39 :	Effet de la concentration en substrat sur la vitesse de réaction pour une enzyme de comportement michaelien.....	54
Fig.I.40 :	Structure de la sous- unité constituant l'enzyme PFDH.....	56
Fig.I.41 :	Schéma d'un mécanisme possible pour la réaction de dissmutation des aldéhydes catalysée par la PFDH.....	57
Fig.I.42 :	Structure chimique de la flavine-mononucléotide (FMN).....	59
Fig.I.43 :	Structure générale de la L-lactate oxydase extraite de <i>A.viridans</i> . (a) Structure du tétramère, (b) Structure des monomères vu de côté dans le site actif où le cofacteur FMN est situé.....	60
Fig.I.44 :	Mécanismes rapportés pour l'oxydation enzymatique du L-lactate par la L-lactate oxydase (voie 1) et L-lactate monooxygénase (voie 2).....	61
Fig.I.45 :	Représentation en 3D de la structure cristalline aux rayons X de l'isoenzyme C peroxydase de raifort. En rouge : le groupe hème ; en bleu : les deux atomes de calcium	62
Fig.I.46 :	Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation de l'enzyme.....	65
Fig.I.47 :	Structure chimique du Nafion.....	67
Fig.I.48 :	Modèle de réseau de « cluster » pour la morphologie de Nafion hydraté.....	69
Fig.I.49 :	Résumé des formes possibles du glutaraldéhyde en solution aqueuse.....	71
Fig.I.50 :	Réactions des enzymes avec le GA dans des conditions acides (a) et basiques (b).....	72
Fig.II.1 :	Consommation mondiale d'éthanol en 2011 par segment de marché (a) et répartition des différentes utilisations du méthanol en 2009 (b).....	95
Fig.II.2 :	Métabolisme du méthanol.....	96
Fig.II.3 :	Métabolisme de l'éthanol.....	97
Fig.II.4 :	Présentation des trois types de transducteurs interdigités utilisés dans ce travail. (a) : BVTT, (b) : IPSL, (c) : CNM.....	102
Fig.II.5 :	Constitution du biocapteur bienzymatique AOX/HRP.....	103
Fig.II.6 :	Schéma du montage utilisé pour la mesure conductimétrique.....	104
Fig.II.7 :	Comparaison des trois types de transducteurs : (▲) : CNM ; (■) : IPSL et (●) : BVTT. Mesures en mode non différentiel dans le tampon phosphate 5 mM pH. Potentiel appliqué: 10 mV – Fréquence : 100 kHz.....	106

Fig.II.8 :	Détachement des biomembranes contenant les deux enzymes AOX d' <i>H. polymorpha</i> et HRP après reconditionnement dans le tampon phosphate.....	107
Fig.II.9 :	Comparaison des réponses des biocapteurs conductimétriques préparés avec différentes alcool oxydases. [MeOH] = 1 mM dans du tampon phosphate 5 mM pH 7.....	108
Fig.II.10 :	Comparaison des valeurs de la vitesse initiale des biocapteurs conductimétriques préparés avec différentes alcool oxydases. [MeOH] = 1 mM dans du tampon phosphate 5 mM pH 7.....	109
Fig.II.11 :	Comparaison des valeurs de la variation de conductance mesurée à l'équilibre des biocapteurs conductimétriques préparés avec différentes alcool oxydases. [MeOH] = 1 mM dans du tampon phosphate 5 mM pH 7.....	109
Fig.II.12 :	Comparaison de l'activité enzymatique de deux solutions d'AOX avec (a) et sans (b) présence de glycérol conservés soit à 4°C soit à -20°C.....	110
Fig.II.13 :	Evolution de l'activité catalytique d'une solution contenant 5 % (m/v) d'AOX, 5 % (m/v) de BSA et 10 % (m/v) de glycérol conservée à -20°C et subissant des cycles de congélation/décongélation à chaque mesure.....	111
Fig.II.14 :	Réponse du biocapteur en fonction de la concentration en AuCl_4^- . [MeOH] = 1 mM. Mesure dans du tampon phosphate 5 mM pH 7.....	113
Fig.II.15 :	Influence de l'ajout de HRP sur le signal du biocapteur conductimétrique.[MeOH] = 1 mM. Mesure dans du tampon phosphate 5 mM pH 7.....	113
Fig.II.16 :	Influence de la quantité d'AOX (<i>H. polymorpha</i>) sur la réponse des biocapteurs. Immobilisation : vapeurs de GA, 30 min. Mesure dans le tampon phosphate 5 mM pH 7 (a) : en terme de vitesse initiale – (b) : en terme de variation de conductance.....	115
Fig.II.17 :	Influence de la quantité de BSA sur la réponse du biocapteur bienzymatique AOX 10 %, HRP 15 % . Immobilisation : vapeurs de GA, 45 min. Mesure dans le tampon phosphate 5 mM pH 7.....	116
Fig.II.18 :	Influence du temps d'exposition au GA sur la réponse du biocapteur bienzymatique AOX 5 %, HRP 15 %, BSA 5 % (m/v. Mesure dans le tampon phosphate 5 mM pH 7.....	117
Fig.II.19 :	Influence du pH du milieu sur le fonctionnement du biocapteur conductimétrique bienzymatique AOX 5 %, HRP 15 % . Immobilisation : vapeurs de GA, 30 min. [MeOH] = 2,9 mM. Mesure dans du tampon phosphate 5 mM.....	118
Fig.II.20 :	Influence de la concentration du tampon sur les réponses du biocapteur AOX/HRP [MeOH] = 3,25 mM dans du tampon phosphate pH 7.....	119
Fig.II.21 :	Stabilité de stockage du biocapteur bienzymatique AOX/HRP pendant 40 jours. [HCHO] = 3,25 mM dans du tampon phosphate 5 mM pH 7.....	120
Fig.II.22 :	Influence de la concentration du tampon sur les réponses du biocapteur AOX/HRP [MeOH] = 3,25 mM dans du tampon phosphate pH 7.....	121
Fig.III.1 :	Schéma simplifié des voies majeures de fermentation du glucose par les bactéries lactiques.....	125
Fig.III.2 :	Constitution du biocapteur LODP / HRP.....	130
Fig.III.3 :	Influence de la quantité de HRP sur la réponse du biocapteur. (a) LODP 5 %, HRP 5 % - (b) LODP 5 % - (c) LODP 5 %, HRP 15 %. Injection d'une solution de 100 μM de L-lactate. Mesures réalisées dans 5 mM de tampon phosphate pH 6.....	132

Fig.III.4 :	Mécanismes d'oxydation enzymatique du L-lactate par la L-lactate oxydase (voie 1) et la L-lactate monooxygénase (voie 2).....	132
Fig.III.5 :	Influence du pH sur la variation de conductance à l'équilibre du biocapteur à LODP seule (■) ou à LODP/HRP (●). Mesures effectuées à l'aide d'une solution 100 μ M de L-lactate dans du tampon phosphate 5 mM.....	134
Fig.III.6 :	Influence du temps de réticulation sur l'intensité du signal du biocapteurs bi-enzymatique LODP/HRP. Mesures effectuées à l'aide d'une solution de 100 μ M de L-lactate dans du tampon phosphate 5 mM.....	135
Fig.III.7 :	Mesure de la sélectivité de catalyse de la LODP vis-à-vis du L (◆) et du D (●) Lactate par spectrophotométrie.....	136
Fig.III.8 :	Influence de la concentration en L-lactate (a) et D-lactate (b) sur la réponse des biocapteurs LODP et LODP/HRP. Les mesures ont été réalisées dans 5 mM de tampon phosphate pH 6.....	138
Fig.III.9 :	Influence du temps de réticulation sur la stabilité au stockage du biocapteur LODP/ HRP. 100 μ M de L-lactate dans 5 mM de tampon phosphate pH 6. Biocapteurs conservés à 4°C dans 20 mM de tampon phosphate pH 7 entre deux mesures.....	139
Fig.III.10 :	Comparaison des réponses du biocapteur LODP/HRP obtenues pour le L-lactate en présence d'éventuelles substances interférentes. [L-lactate] = 100 μ M dans 5 mM de tampon phosphate pH 6.....	140
Fig.IV.1 :	Utilisations domestiques de produits contenant du formaldéhyde.....	150
Fig.IV.2 :	Représentation schématique des trois modes d'immobilisation sur les surfaces des électrodes ; Immobilisation par (a) réticulation par des vapeurs de GA, (b) piégeage sous une membrane de Nafion, (c) les deux méthode combinées.....	155
Fig.IV.3 :	Schéma de fixation de la pFDH sur les nanoparticules.....	155
Fig.IV.4 :	Influence du mode d'immobilisation de l'enzyme sur le signal du biocapteur. Réticulation 30 min à l'aide de vapeurs de GA sans (a) et avec un revêtement de Nafion (b). 0,045 mg de pFDH et 13 μ g NAD ⁺ co-immobilisés dans la biomembrane - [HCHO] = 10 mM dans du tampon phosphate 5 mM, pH 7, sans ajout supplémentaire de cofacteur en solution, T = 23°C \pm 2°C.....	158
Fig.IV.5 :	Influence de la quantité de pFDH sur le signal du biocapteur et sur la pente initiale de la réponse du biocapteur. 0,045 mg de pFDH et 13 μ g de NAD ⁺ co-immobilisés dans la biomembrane - [HCHO] = 10 mM dans du tampon phosphate 5 mM, pH 7, sans ajout supplémentaire de cofacteur en solution, T = 23°C \pm 2°C.....	159
Fig.IV.6 :	Effet de l'ajout supplémentaire de 20 μ M de NAD ⁺ dans la solution de mesure sur la stabilité du signal du biocapteur. 0,045 mg de pFDH et 13 μ g NAD ⁺ co-immobilisés dans la biomembrane. [HCHO] = 10 mM dans du tampon phosphate 5 mM, pH 7, T = 23°C \pm 2°C.....	160
Fig.IV.7 :	Influence du temps de réticulation sur la stabilité du biocapteur et sur le signal (insert). 0,045 mg de pFDH et 13 μ g NAD ⁺ co-immobilisés dans la biomembrane et la membrane Nafion. [HCHO] = 10 mM dans du tampon phosphate 5 mM, pH 7, T = 23°C \pm 2°C.....	161
Fig.IV.8 :	Influence des modifications d'électrode sur les diagrammes d'admittance de Nyquist. Potentiel appliqué: 10 mV, gamme de fréquence balayée: 100 MHz - 100 kHz. Mesure en tampon phosphate 5 mM, pH 7.....	162

Fig.IV.9 :	Influence de l'épaisseur de la membrane Nafion sur la partie réelle de l'admittance à 40 kHz. Potentiel appliqué: 10 mV. Mesure en tampon phosphate 5 mM, pH 7.....	162
Fig.IV.10 :	Effet de l'épaisseur de la membrane Nafion sur le signal du biocapteur (●) et sur le temps de réponse (■). 0,045 mg de pFDH et 13 µg NAD ⁺ co-immobilisés dans la biomembrane par GA pendant 30 minutes. [HCHO] = 2 mM - 20 µM de NAD ⁺ ajoutés dans le tampon phosphate 5 mM, pH 7, T = 23°C±2°C.....	163
Fig.IV.11 :	Influence sur la réponse du biocapteur de la concentration en tampon (a) ou de NaCl (b) en présence (●) et en absence (▲) de membrane Nafion. 0,045 mg de pFDH et 13 µg NAD ⁺ co-immobilisés dans la biomembrane par des vapeurs de GA pendant 30 minutes. [HCHO] = 2 mM - 20 µM de NAD ⁺ ajoutés dans le tampon phosphate 5 mM, pH 7, T = 23°C±2°C.....	164
Fig.IV.12 :	Influence du pH sur le signal du biocapteur conductimétrique. 0,045 mg de pFDH et 13 µg NAD ⁺ co-immobilisés dans la biomembrane par des vapeurs de GA pendant 30 minutes. [HCHO] = 5 mM - 20 µM de NAD ⁺ ajoutés dans le tampon phosphate 5 mM, T = 23°C±2°C.....	165
Fig.IV.13 :	Droite d'étalonnage du biocapteur conductimétrique mesurée dans les conditions optimales. 0,045 mg de pFDH et 13 µg NAD ⁺ co-immobilisés dans la biomembrane par des vapeurs de GA pendant 30 minutes membrane Nafion. 20 µM de NAD ⁺ ajoutés dans le tampon phosphate 5 mM, T = 23°C±2°C.....	166
Fig.IV.14 :	Reproductibilité à court-terme de la réponse du biocapteur. 0,045 mg de pFDH et 13 µg NAD ⁺ co-immobilisés dans la biomembrane. [HCHO] = 5 mM. 20 µM NAD ⁺ ajoutés dans le tampon phosphate 5 mM, pH 7, T = 23°C±2°C.....	166
Fig.IV.15 :	Etude d'interférences avec différents alcools primaires à chaîne linéaire (méthanol à pentanol). [HCHO] = [Alcool] = 10 mM dans le tampon phosphate 5 mM pH 7	168
Fig.IV.16 :	Comparaison des réponses du biocapteur à pFDH vis-à-vis de différents aldéhydes. [Aldéhyde] = 10 mM dans tampon phosphate 5 mM pH 7.....	169
Fig.IV.17 :	Réponse du biocapteur à pFDH sans membrane Nafion vis-à-vis du formaldéhyde et de l'acétaldéhyde. [Aldéhyde] = 4 mM dans tampon phosphate 5 mM pH 7.....	171

Liste des tableaux

Tableau I.1 :	Valeurs de la conductivité molaire ionique (λ_i) de certains ions à 25°C.....	28
Tableau I.2 :	Nomenclature et pourcentage des principaux groupes d'enzymes répertoriés.....	37
Tableau I.3 :	Liste des acides aminés, leurs abréviations et leurs formules	39
Tableau I.4 :	Quelques exemples de facteur d'accroissement de vitesse réactionnelle en présence d'enzymes.....	43
Tableau I.5 :	Valeurs des constantes catalytiques de Michaelis et de spécificité de quelques enzymes (site brenda.com).....	51
Tableau I.6 :	Paramètres cinétiques (V_M et K_M) de la formaldéhyde déshydrogénase pour divers aldéhydes et alcools.....	57
Tableau I.7 :	Activités relatives des alcools oxydases extraites de différentes souches de levure et de champignon pour divers alcools. L'activité pour méthanol est arbitrairement fixée à 100 % pour AOX de chaque souche.....	59
Tableau I.8 :	Avantages et inconvénients des différentes techniques d'immobilisation.....	66
Tableau I.9 :	Exemples d'application des nanoparticules à l'immobilisation de biomolécules.....	74
Tableau II.1 :	Caractéristiques physico-chimiques du méthanol et de l'éthanol.....	95
Tableau II.2 :	Comparaison des valeurs de K_M des trois alcool oxydases commercialisées par Sigma Aldrich.....	107
Tableau II.3 :	Comparaison entre l'activité enzymatique déclarée et celle mesurée pour trois alcool oxydases commerciales.....	108
Tableau III.1 :	Caractéristiques physico-chimiques de l'acide lactique.....	126
Tableau III.2 :	Performances analytiques de quelques biocapteurs à base de LODP ou LODP/HRP pour l'analyse du lactate dans les aliments.....	141
Tableau III.3 :	Comparaison des teneurs en D-et L-lactate déterminées dans des échantillons de yaourt par notre méthode et une méthode de référence (kit enzymatique commercial).....	145
Tableau IV.1 :	Caractéristiques physico-chimiques du formaldéhyde.....	149
Tableau IV.2 :	Caractéristiques analytiques des différentes méthodes chromatographiques et spectrofluorimétriques pour la détermination du formaldéhyde.....	152
Tableau IV.3 :	Comparaison des performances de quelques biocapteurs rapportés dans la littérature pour la détection du formaldéhyde.....	167
Tableau IV.4 :	Tableau.IV.4: Paramètres cinétiques (V_M et K_M) de la pFDH pour HCHO et CH ₃ CHO par mesures de pH-stat.	170
Tableau IV.5 :	Tableau.IV.5: Paramètres cinétiques (V_M et K_M) de la pFDH pour les aldéhydes	171
Tableau IV.6 :	Analyse des échantillons d'eaux dopés avec le formaldéhyde.....	172

Abréviations

Aa : acide aminé

ABTS : 2,2' azinobis(3-éthylbenzothiazoline) 6 sulfonate

Ac : anticorps

ADH : alcool déshydrogénase

AFM : Atomic force microscopy (microscope à force atomique)

Ag : antigène

ALDH : aldéhyde déshydrogénase

AOX : alcool oxydase

BDD : boron doped diamond (diamant dopé au bore)

BSA : Bovine serum albumin (albumine de sérum bovin)

BVTT : BVT Technologies

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

CNM : Centro Nacional de Microelectronica

CPE : constant phase element (élément à phase constante)

CVD : chemical vapor deposition

EIS : electrochemical impedance spectroscopy (spectroscopie d'impédance électrochimique)

Enz : enzyme

EW : equivalent weight

FAD : flavine adénine dinucléotide

FDH : formaldéhyde déshydrogénase

FET : field-effect transistor (transistor à effet de champ)

FMN : Flavine mononucléotide

GA : glutaraldéhyde

GC : chromatographie en phase gazeuse

GOD : glucose oxydase

GSH : glutathion

HansPFH : formaldéhyde déshydrogénase extrait de *Hansenula polymorpha*

HPLC : chromatographie liquide à haute performance

HRP : horseradish peroxydase (peroxydase de raifort)

IDE : interdigitated electrode (électrode interdigitée)

IDM : interdigitated microelectrode (microélectrode interdigitée)

Ig : immunoglobuline

IPSL : Institut de Physique des Semi-conducteurs Lashkaryov

ISE : ion selective electrode (électrode à membrane sélective aux ions)

ISFET : ion-sensitive field-effect transistor (transistor à effet de champ sensible aux ions)

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

LAPS : light-addressable potentiometric sensor (capteur potentiométrique adressable par lumière)

LED : light-emitting diode (diode électroluminescente)

LDH : lactate déshydrogénase

LD : limite de détection

LODP : lactate oxydase extraite de *Pediococcus sp.*

LOX : lactate oxydase

MDH : méthanol déshydrogénase

MS : spectrométrie de masse

MWCNT : single-wall carbon nanotube (nanotube de carbone multifeuillet)

MZI : Mach-Zender interferometer (interféromètre Mach-Zender)

NAD : nicotinamide adénine dinucléotide

NADP : nicotinamide adénine dinucléotide réduit

PAH : poly(hydrochlorure d'allylamine)

PEI : polyéthylèneimine

pFDH : formaldéhyde déshydrogénase extraite de *Pseudomonas putida*

ppb : partie par billion

PTFE : polytétrafluoroéthylène

PVA : polyvinyl alcohol (alcool polyvinylique)

PVD : physical vapor deposition

QCM : quartz crystal microbalance (microbalance à quartz)

SPR : Surface plasmon resonance (résonance plasmonique de surface)

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

L'industrialisation intensive ainsi que les utilisations agricoles et domestiques d'un nombre croissant de produits chimiques ont conduit à la dissémination de nombreux composés dans l'environnement, à l'origine d'une pollution importante des écosystèmes. Ces composés peuvent avoir de graves répercussions sur la santé des organismes vivants, en particulier celle de l'Homme. Il existe donc à l'heure actuelle une forte demande pour des méthodes d'analyse rapides et peu coûteuses permettant le suivi des polluants chimiques présents dans l'environnement et l'évaluation de leurs effets toxiques. Ces outils permettraient également de diminuer les coûts d'analyse dans le domaine de l'agroalimentaire et l'analyse clinique. Les méthodes classiques disponibles actuellement dans ces différents domaines sont en effet souvent longues à mettre en œuvre et onéreuses, et nécessitent du personnel hautement qualifié.

Parmi les dispositifs capables de répondre à cette demande figurent les biocapteurs qui associent un élément sensible de nature biologique (anticorps, enzyme, microorganisme, ADN...) doté d'un pouvoir de reconnaissance pour un analyte ou un groupe d'analytes à un transducteur pouvant être de type électrochimique, optique ou thermique. Un grand nombre de travaux ont été consacrés ces dernières décennies au développement de biocapteurs pour des applications très variées dans le domaine de la santé, l'environnement ou le contrôle qualité des produits agroalimentaires. Des progrès essentiels ont été réalisés en matière de miniaturisation des transducteurs (nanoélectrodes, nanoguides d'onde, BioMEMs) permettant d'envisager une réduction importante de la quantité d'entité biologique nécessaire à la réalisation du biocapteur, mais également l'intégration dans des laboratoires sur puce. Des progrès dans les domaines de la numérisation et de la transmission des données ainsi que de leur traitement permettent à présent la réalisation de microarrays pour la multidétection de polluants. Cependant, très peu de systèmes ont à ce jour été commercialisés. En effet, d'importants efforts restent encore à réaliser pour l'obtention d'outils robustes et sensibles utilisables en routine.

Dans ce contexte, le travail réalisé visait à mieux comprendre et à optimiser le fonctionnement de trois biocapteurs en vue de la détection conductimétrique d'analytes d'intérêt environnemental ou alimentaire. Ces trois biocapteurs avaient pour point commun d'utiliser comme biorécepteurs des enzymes de la famille des oxydo-réductases immobilisées

sur des microélectrodes interdigitées en or. Ces enzymes (alcool oxydase, AOX, lactate oxydase, LOX, et formaldéhyde déshydrogénase, FDH) présentent des structures quaternaires multimériques dont la dissociation, sous l'effet de l'immobilisation sur le transducteur, peut conduire à leur inactivation. L'AOX et la LOX sont toutes les deux des oxydases, mais l'AOX est déjà connue pour ses problèmes de stabilité en solution. La LOX, quant à elle, est rapportée comme catalysant spécifiquement l'oxydation de l'énantiomère L-lactate (par rapport au D-lactate) en solution. On peut imaginer que l'immobilisation de ces deux enzymes puisse avoir un effet sensible sur leur activité et leur sélectivité. La FDH enfin a été choisie comme représentant de la catégorie des réductases et nécessite la participation d'un co-facteur, contrairement aux deux oxydases. Dans chacun des cas, nous nous sommes attachés à optimiser différents paramètres de fabrication ou de mesure afin de maximiser les performances des biocapteurs en terme de sélectivité, de limite de détection, de reproductibilité et de stabilité. Nous avons par ailleurs étudié l'effet de l'association des oxydases à une deuxième enzyme, la peroxydase de raifort (HRP), ainsi que l'ajout d'une membrane ionique, le Nafion, dans le cas de la déshydrogénase. Nous avons enfin évalué les potentialités d'application des deux biocapteurs conductimétriques à base de LOX et FDH à l'analyse d'échantillons réels.

Ce mémoire est organisé en quatre chapitres. Le premier chapitre est consacré aux biocapteurs (principe de fonctionnement, différents constituants, modes de transduction, techniques d'immobilisation des biorécepteurs), aux enzymes (classification, structure et mécanisme catalytique, cinétique) et aux interactions enzyme/transducteur.

Les chapitres suivants regroupent l'ensemble des résultats de ce travail. Le deuxième chapitre concerne le développement du biocapteur à AOX pour la détection des alcools primaires à chaînes courtes, le troisième décrit les résultats obtenus pour le biocapteur à LOX (détection du lactate) et le dernier présente l'étude du biocapteur à FDH visant la détection du formaldéhyde.

Une synthèse des résultats est enfin réalisée dans la conclusion où nous avons essayé de dégager des tendances et tenter de relier les comportements communs ou individuels des enzymes vis-à-vis de la méthode d'immobilisation par la vapeur de GA ou de certains autres paramètres avec les caractéristiques de ces enzymes. La conclusion se termine par les perspectives de ce travail.

CHAPITRE I

I.1 Définition et fonctionnement des biocapteurs

«Biosensor» (en français «biocapteur»)

A device that uses specific biochemical reactions mediated by isolated enzymes, tissues, immunosystems, organelles or whole cells to detect chemical compounds usually by electrical, thermal or optical signals.

Glossary for chemists of terms used in biotechnology (IUPAC) Recommendations 1992, page 148

I.1.1 Histoire des biocapteurs

On peut dire que l'histoire des biocapteurs a débuté dans les années 1950 grâce au développement par L.C Clark d'une électrode permettant de mesurer l'oxygène dissous dans le sang des patients ayant subi des interventions chirurgicales¹. Par la suite, Lyons et Clark² ont proposé de coupler cette électrode à une enzyme en vue d'une application dans le domaine de la chirurgie cardiovasculaire. Dans ce premier biocapteur, l'enzyme glucose oxydase (GOD), immobilisée sur l'électrode à oxygène via une membrane de dialyse, catalysait l'oxydation du glucose en consommant l'oxygène. Dans les années qui ont suivi, de nombreuses études ont été réalisées afin de mieux comprendre le fonctionnement de ce premier biocapteur à glucose³ ou dans le but d'appliquer son principe au développement d'autres biocapteurs enzymatiques. On peut ainsi citer par exemple le biocapteur potentiométrique proposé par Guilbault et Montalvo en 1969 pour la détection de l'urée⁴. Mais ce n'est qu'en 1975 que le premier biocapteur à glucose basé sur la détection ampérométrique du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) fut commercialisé par la société Yellow Springs Instrument (Ohio, Amérique).

Depuis, l'engouement pour ce type d'outil n'a cessé de croître, conduisant à des évolutions considérables. Les enzymes ont été remplacées par des bactéries dans les biocapteurs proposés par Diviès⁵ dans la dernière moitié des années 70. L'incorporation du biocapteur à glucose électrochimique dans le pancréas a pu être réalisée par Clemens *et al*⁶. A la même période, un biocapteur enzymatique utilisant la lactate déshydrogénase (LDH), a été commercialisé par Roche (Suisse) pour la détection du lactate. Il a été le précurseur d'une nouvelle génération de biocapteurs employant un médiateur soluble, les sels de ferrocyanure, dont le rôle est d'améliorer le transfert des électrons issus de la réaction enzymatique entre les biomatériaux et l'électrode. L'utilisation de ces sels et de leurs dérivés a été ensuite étendue aux capteurs utilisant des oxydoréductases, telles que la

GOD⁷ en 1984. Des anticorps ont également été employés pour la construction d'immuno-capteurs⁸. De nouvelles techniques de détection permettant le suivi en temps réel des réactions d'affinité, telle que la Résonance plasmonique de surface (SPR), ont été développées dans les années 90. C'est également à cette époque qu'ont été commercialisées par la société MediSense's les premières électrodes de carbone sérigraphiées.

Enfin, les progrès réalisés dans le domaine des biocapteurs depuis le début du 21^{ème} siècle ont été possibles grâce à l'évolution des micro- et des nanotechnologies, des sciences des matériaux, de la biotechnologie ou de l'informatique. Les chercheurs sont maintenant capables d'isoler et de manipuler des structures, telles que l'ADN ou les récepteurs, de les associer avec des nanotubes de carbones ou des nanoparticules d'or ou d'argent. Les transducteurs sont par ailleurs de natures très variées et de tailles de plus en plus petites. Les performances et la simplicité de fonctionnement des biocapteurs ont été fortement améliorées. Les techniques de traitement du signal deviennent plus rapides et précises. La possibilité de combiner une large gamme d'entités biologiques et de transducteurs permet la résolution de problèmes analytiques très variés dans le domaine de la santé, de l'agroalimentaire ou encore de l'environnement.

I.1.2 Généralités sur les biocapteurs

I.1.2.1 Définition et fonctionnement général du biocapteur

Le biocapteur est un outil analytique permettant, grâce à l'alliance entre une entité BIOLOGIQUE et un TRANSDUCTEUR, de déceler un phénomène biologique ou physiologique, le convertir en une indication physique mesurable, quantifiable et simple à exploiter.

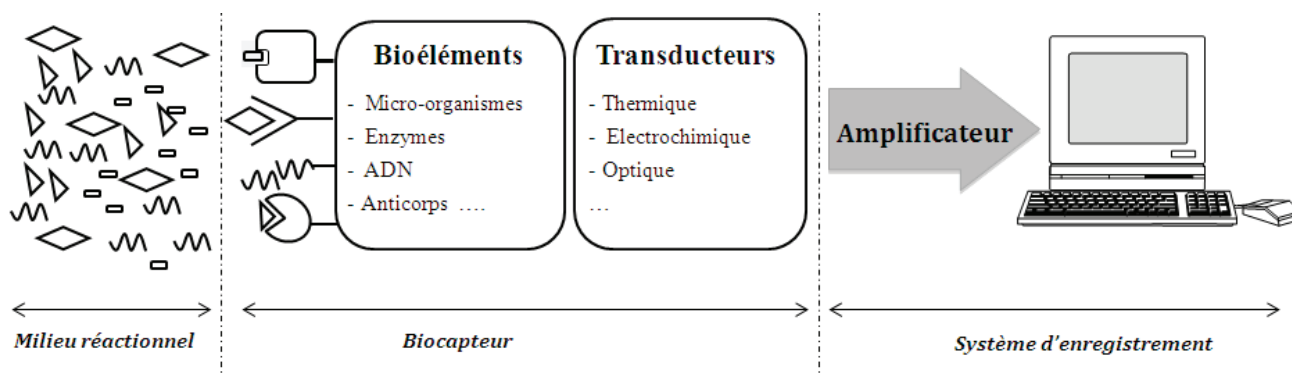


Fig.I.1 : Schéma du principe de fonctionnement d'un biocapteur

Comme l'illustre la figure I.1, le premier maillon essentiel du système est constitué du bioélément (ou biorécepteur) qui possède un pouvoir de reconnaissance spécifique vis-à-vis des

espèces chimiques ou biologiques ciblées et qui peut éventuellement les transformer. L'immobilisation des bioéléments sur la surface sensible du capteur s'effectue par voie chimique ou physique. Les interactions spécifiques entre les biorécepteurs et les analytes induisent des modifications physico-chimiques du milieu qui sont ensuite détectées et converties en réponse physique par le système de transduction. Une unité d'amplification et de traitement du signal adéquate est également nécessaire au bon fonctionnement du dispositif.

I.1.2.2 Qualités métrologiques du biocapteur

Un biocapteur, comme tout outil d'analyse, est un organe de saisie d'informations. Les performances des biocapteurs sont généralement évaluées expérimentalement par leur sensibilité, leur limite de détection (LD), leur gamme linéaire et dynamique, leur reproductibilité et/ou leur sélectivité. Les autres paramètres évalués incluent le temps de réponse, la stabilité opérationnelle et de stockage du capteur. Idéalement, la surface de détection est régénérée pour que le transducteur soit recyclable. Toutefois, dans certains cas, notamment dans le domaine de l'analyse clinique, l'usage unique peut être plus adapté.

I.1.3 Classification des biocapteurs

Les biocapteurs sont généralement classés en fonction de la nature des biorécepteurs et des transducteurs qui les composent.

I.1.3.1 Classification selon la nature des biorécepteurs

Le choix de l'élément de reconnaissance est primordial dans la construction d'un biocapteur. Il doit être réalisé en fonction de différents critères tels que sa stabilité, sa facilité d'utilisation ou de recyclage ainsi que sa spécificité et son affinité vis-à-vis de l'analyte à détecter.

Les biorécepteurs sont généralement classés en deux catégories selon la nature de leur interaction vis-à-vis des analytes (affinité ou reconnaissance biocatalytique). Dans le premier cas, aucune réaction chimique n'a lieu, il n'y a pas donc de destruction de la molécule cible. Le processus de reconnaissance implique la création d'interactions de type ligand/récepteur membranaire, antigène/anticorps ou molécule cible/ADN. Dans le second cas, les composés cibles sont transformés par le biais d'une réaction catalysée par une enzyme, isolée ou maintenue dans son environnement naturel (cellules entières, tissus animaux/végétaux).

Récepteurs membranaires

Les organismes vivants reçoivent les différentes informations nécessaires à leur activité via des stimulations ou des molécules de signalisation extracellulaires telles que les hormones, les neurotransmetteurs ou les molécules odorantes. Afin de transmettre les bons signaux, la détection de ces molécules doit être spécifique. Cette tâche est assurée par les multiples récepteurs membranaires se situant au niveau de la membrane cytoplasmique, constituant l'interface entre milieu extra et intracellulaire.

Ces récepteurs sont des protéines membranaires dont la structure est codée par un gène. Ils peuvent être classés en 3 catégories selon leur constitution et leur mode d'action. Il existe des récepteurs à canaux ioniques, activés par un ligand, des récepteurs possédant une activité enzymatique et des récepteurs liés aux protéines G. Les signaux et molécules extracellulaires émises sont interceptés au niveau de récepteurs membranaires spécifiques qui peuvent jouer le rôle de biorécepteurs lorsqu'ils sont associés aux différents types de transducteurs. Les récepteurs les plus utilisés dans la construction des biocapteurs sont les chimiorécepteurs⁹, les récepteurs hormonaux¹⁰ ainsi que les récepteurs olfactifs¹¹ (Fig.I.2).

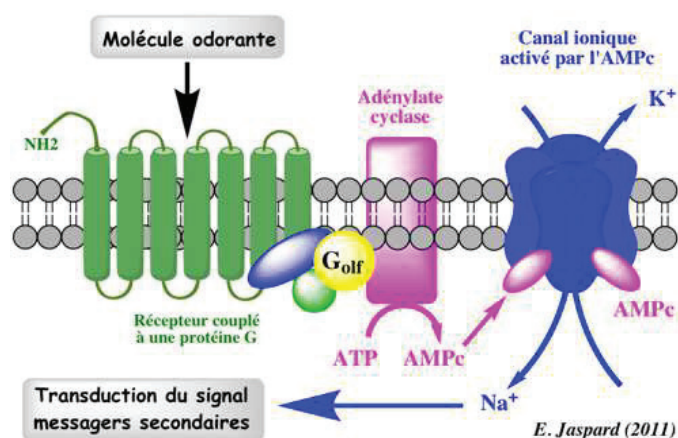


Fig.I.2 : Structure schématique du récepteur membranaire olfactif

Anticorps

Les anticorps (Ac) ou immunoglobulines (Ig) dont la principale fonction est d'identifier et de neutraliser les corps étrangers tels que les bactéries ou les virus, sont des protéines en forme de Y localisées essentiellement dans le sérum sanguin, les liquides musculaires ou les muqueuses des vertébrés (Fig.I.3). L'identification des corps étrangers par les anticorps s'effectue au niveau d'une partie particulière de la cible étrangère. Cette dernière est appelée antigène (Ag).

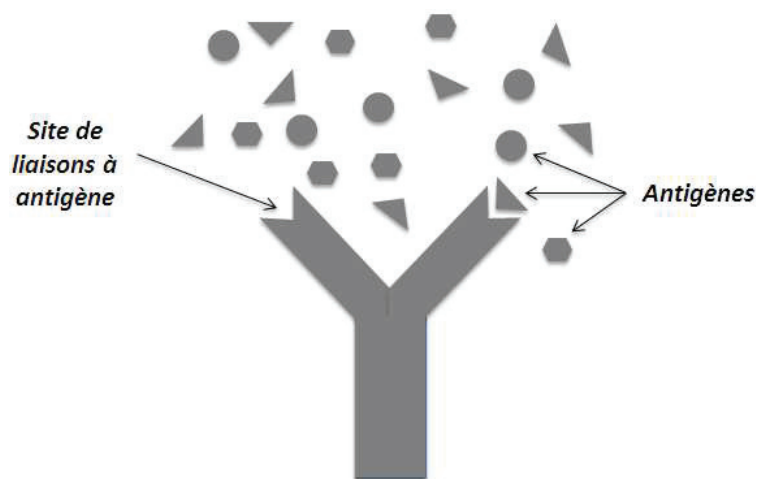


Fig.I.3 : Schéma de principe de l'interaction Ac-Ag

La réaction Ac-Ag est extrêmement spécifique. La forme des antigènes doit correspondre exactement au site de fixation puisque l'interaction Ac-Ag met en jeu des liaisons faibles non covalentes telles que des liaisons hydrogènes ou des interactions de nature électrostatique. C'est sur ce principe que fonctionnent les biocapteurs à la base d'Ac, plus communément appelés immuno-capteurs¹²⁻¹⁵.

ADN

L'ADN (acide désoxyribonucléique) est une macromolécule biologique constituant les bases génétiques et d'informations nécessaires au développement et au fonctionnement de toutes les cellules vivantes. Dans les cellules eucaryotes, l'ADN se trouve non seulement dans le noyau mais également dans les mitochondries et les chloroplastes. Dans les cellules plus simples des procaryotes, l'ADN est localisé dans le cytoplasme.

Les macromolécules d'ADN sont constituées d'une double hélice droite dont les deux brins sont complémentaires. Chaque brin est un enchaînement de nucléotides constitués d'un groupement phosphate, d'un sucre (le désoxyribose) et d'une base azotée assurant la diversité des molécules d'ADN ainsi que la liaison entre les deux brins de l'hélice (Fig.I.4).

Les biocapteurs à base d'ADN sont obtenus en immobilisant un ou deux brins d'acide nucléique sur la surface des transducteurs^{16, 17}. Des biocapteurs utilisant de l'ADN simple brin ont été développés pour la détection de cancers^{18, 19}, de pathogènes bactériens^{20, 21} ou pour la mise en évidence des détériorations des molécules d'ADN par certains polluants^{22, 23}. L'utilisation des molécules d'ADN double brin a également permis d'énormes progrès dans le domaine de la détection rapide des toxines, des substances organiques carcinogènes^{24, 25} ou encore dans l'identification de nouveaux principes actifs anti-tumoraux^{26, 27}.

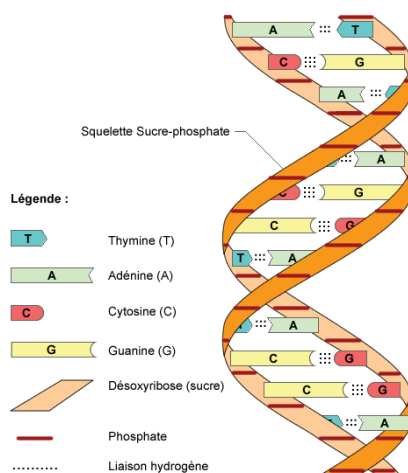


Fig.I.4: Structure schématique et composition de l'ADN

Tissus végétaux ou animaux

Certains tissus animaux ou végétaux ont également été utilisés comme bioéléments de reconnaissance pour l'élaboration de biocapteurs. Ils renferment un grand nombre d'enzymes catalysant des réactions très variées. A titre d'exemple, des tissus végétaux de fruits ou des feuilles de concombre ont été immobilisés sur un transducteur en vue de la détection de la dopamine et de la cystéine en mettant respectivement à profit l'activité catalytique de la polyphénolase et de la sulfite oxydase²⁸. On peut également mentionner les biocapteurs à tissus animaux, tels que les tissus de rein porcin associés à une détection par chimioluminescence pour la détermination de l'acide lactique²⁹ ou le foie de volaille utilisé pour le screening par SPR des résidus de la nicarbazine, un additif alimentaire³⁰.

Ce type de bioélément, contrairement aux enzymes, ne nécessite pas d'extraction ni de purification, réduisant ainsi le coût du biocapteur. Par ailleurs, il n'est pas nécessaire de régénérer les cofacteurs des enzymes mises en œuvre. Toutefois, ces dispositifs souffrent d'un temps de réponse plus long et d'un manque de sensibilité et de sélectivité.

Cellules entières

Il s'agit généralement de cellules entières de bactéries, de virus, de champignons, d'algues ou de levures (Fig.I.5). Ces entités peuvent être inactives ou être maintenues vivantes après immobilisation sur le transducteur. Dans le premier cas, le mode de reconnaissance est basé sur l'adsorption des analytes, fréquemment des ions métalliques sur la membrane cellulaire pourvue de sites de fixation³¹. Les cellules vivantes, quant à elles, possèdent des métabolismes variés qu'elles mettent en œuvre de manière plus ou moins spécifique en présence de sources de stimulation de natures biologiques ou chimiques. Ces cellules sont considérées comme « une usine » d'enzymes, de

coenzymes et de cofacteurs, dotées de la capacité de répondre à certaines molécules. Elles peuvent être massivement produites à faible coût par culture cellulaire, sont faciles à manipuler et sont plus stables que les enzymes isolées³².



Fig.1.5: Image microscopique de *Pseudomonas putida*

Elles constituent donc une alternative intéressante aux enzymes pour élaboration de biocapteurs. Leur manque de sélectivité lié à la présence d'un grand nombre d'enzymes peut être amélioré en ayant recours à l'ingénierie génétique et à la biologie moléculaire. En effet, il est actuellement possible de procéder à des modifications génétiques de micro-organismes par fusion de certains gènes avec des promoteurs, créant des espèces mutantes. Ces gènes rapporteurs peuvent être des gènes de sélection ou des gènes codant pour un caractère recherché ou permettant l'expression d'une enzyme d'intérêt³³.

L'incorporation de cellules vivantes dans la préparation des biocapteurs peut servir à la détermination de molécules ou de familles de molécules particulières³⁴ mais également être utilisée pour le suivi en temps réel du métabolisme cellulaire (consommation d'oxygène, production de dioxyde de carbone et sa perturbation en présence d'un échantillon)³⁵.

Enzymes

Historiquement, les enzymes ont été les premières molécules de reconnaissance intégrées dans des biocapteurs. Ces biomolécules possèdent un pouvoir catalytique très spécifique qui permet d'accélérer les vitesses de réaction d'un facteur 10^3 à 10^6 . On trouvera plus de détails concernant la structure et le fonctionnement de ces biorécepteurs dans le paragraphe I.3.

L'utilisation des enzymes dans l'élaboration des biocapteurs présentent de multiples avantages. Ainsi il existe une grande diversité d'enzymes permettant la détection de nombreux substrats. Par ailleurs, il est possible de modifier les propriétés catalytiques ou la stabilité de ces biomolécules par ingénierie, conduisant à une amélioration significative des performances des biocapteurs enzymatiques³⁶.

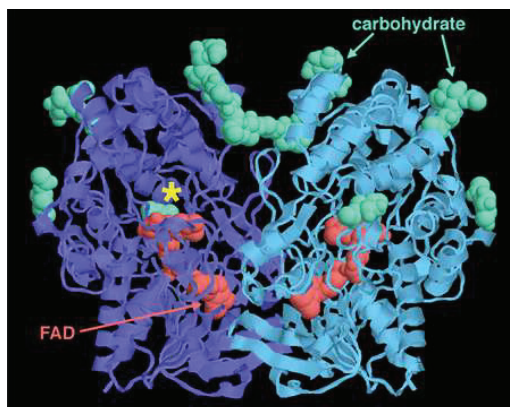


Fig.I.6 : Schéma de la structure de la glucose oxydase extraite d'une moisissure de genre *Penicillium*

Malgré un coût important lié à la production, à la purification et au stockage, de nombreux travaux ont été consacrés au développement de biocapteurs enzymatiques en vue d'applications dans le domaine de l'environnement³⁷, l'analyse biomédicale^{38, 39} ou l'agroalimentaire⁴⁰.

I.1.3.2 Classification des biocapteurs par le mode de détection

Transduction thermique

Ce type de transduction permet de quantifier la variation d'enthalpie accompagnant une réaction biologique, notamment enzymatique. La quantité de chaleur produite ou absorbée est proportionnelle à l'enthalpie molaire et au nombre total de molécules réactives^{41, 42}. La variation d'enthalpie dépend de la température selon la relation suivante :

$$\Delta T = \frac{n\Delta H}{C_p} \quad (\text{Eq.I.1})$$

Avec : **n** : nombre de moles de substrat ayant réagi ; **ΔT** : variation de température ; **ΔH** : variation d'enthalpie ; **C_p** : capacité calorifique totale du système.

Les dispositifs utilisés peuvent être à base de thermo-résistance⁴² ou de thermopile⁴³. Les mesures effectuées par ces outils ne sont généralement pas interférées par la couleur ou la turbidité de l'échantillon. Ils fonctionnent bien avec des solutions à la fois organiques et aqueuses. Malgré une bonne sensibilité, ces outils souffrent toutefois d'un important inconvénient, sa non-spécificité. Il est impossible de distinguer directement entre les changements thermiques spécifiques liés à la réaction analyte/bioélément et ceux non spécifiques. Des montages différentiels sont utilisés pour compenser les fluctuations parasites de température. Ce type de biocapteur est utilisé pour le suivi de l'activité enzymatique, en analyse clinique ou pour le contrôle environnemental^{41, 42}.

Transduction piézoélectrique

Dans certains matériaux diélectriques anisotropes naturels (quartz, topaze, tourmaline ...) et artificiels (céramiques, polymères ...), il existe une relation d'interdépendance entre les propriétés électriques et mécaniques que l'on appelle « piézoélectricité ». Il s'agit d'un processus réversible. L'effet piézoélectrique direct se produit quand une contrainte mécanique est appliquée sur les faces du matériau. Ceci entraîne la déformation du cristal qui s'accompagne d'une polarisation électrique dont l'amplitude croît avec la contrainte appliquée. L'effet piézoélectrique inverse ou électrostriction est la propriété d'un matériau à se déformer sous l'action d'un champ électrique. C'est cet effet qui est exploité dans les capteurs piézoélectriques. Lorsque le champ électrique appliqué est alternatif, on observe une vibration du matériau et la génération d'une onde acoustique. Si la vibration peut être entretenue, tout le circuit électronique se met en résonance.

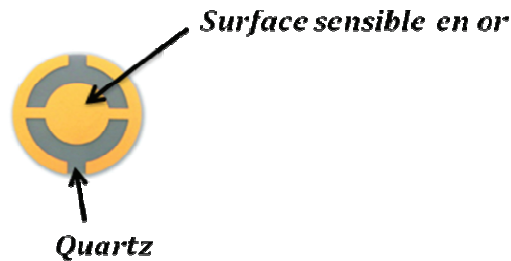


Fig.I.7: Cristal de quartz piézoélectrique

De nombreux cristaux présentent un effet piézoélectrique, mais les propriétés électriques, mécaniques et chimiques du quartz en font le cristal type pour des applications analytiques. Le mode de transduction piézoélectrique le plus utilisé pour les biocapteurs est la microbalance à quartz (QCM)^{44, 45}. Elle comprend un quartz métallisé (généralement un disque de 10 à 16 mm de diamètre avec une épaisseur d'environ 0,15 mm) sur lequel les biorécepteurs sont immobilisés (Fig.I.7). Une tension alternative est appliquée sur le quartz induisant la résonance du quartz à une certaine fréquence. Cette fréquence de résonance varie en présence d'espèces chimiques ou biologiques adsorbées sur le quartz. La loi de Sauerbrey permet de calculer, à partir de la variation de fréquence de vibration, la masse déposée sur la surface (Eq.I.2). Cependant, cette équation ne s'applique que pour des dépôts uniformes, rigides et minces.

$$\Delta f = -2.3 \times 10^{-6} \times f_0^2 \frac{\Delta m}{A} \quad (\text{Eq.I.2})$$

Avec Δf : écart de fréquence à la résonance (en Hz) ; f_0 : fréquence fondamentale du cristal (en Hz) ; Δm : variation de masse (en g) et A : surface de l'électrode (en cm^2)

Cette technique permet actuellement de mesurer de très faibles variations de masse, en temps réel, avec une grande sensibilité et une grande spécificité. Elle est peu coûteuse et repose sur une instrumentation légère. La sensibilité obtenue est environ 100 fois supérieure à celle d'une balance électronique. La limite de détection étant de l'ordre de 1 ng/cm^2 ⁴⁶, ceci signifie que cette technique permet de mesurer des changements de masse équivalents à une monocouche d'atomes, la rendant extrêmement attractive dans de nombreux domaines d'application. Ainsi, ce type de capteur a été utilisé dans le domaine de l'environnement pour la détection de composés organiques volatils ou de bactéries pathogènes¹¹, dans le domaine de l'agroalimentaire⁴⁷ ou dans celui de la santé humaine pour le diagnostic rapide de certaines maladies¹².

Transduction optique

Ce mode de transduction est employé lorsque la reconnaissance des molécules par l'entité biologique immobilisée sur la surface active du transducteur se traduit par des changements de propriétés optiques (absorption/émission de lumière, modification de la permittivité relative à l'interface).

Ce type de transduction a été introduit pour la première fois en 1975 par Lubbers⁴⁸. Il s'agissait alors de la détermination du pH, des concentrations en O_2 ou CO_2 par spectroscopie de fluorescence. La détection était réalisée à l'aide d'une simple fibre dont une extrémité était recouverte d'un colorant sensible au pH. Depuis, de nombreux développements ont été réalisés et un grand nombre de capteurs optiques ont été proposés pour l'analyse biomédicale, agro-alimentaire ou environnementale^{34, 38, 49, 50}.

Ces biocapteurs offrent l'avantage d'être insensibles aux interférences électromagnétiques et peuvent s'utiliser aisément pour la télédétection et/ou la détection multiplexée de nombreux analytes, ce qui explique le fait qu'ils soient aussi répandus. Les trois grands types de transducteurs optiques sont la fibre optique, l'interféromètre Mach-Zehnder (MZI) et le résonateur plasmonique de surface (SPR).

Fibre optique

Une fibre optique est un guide d'onde composé d'une couche mince diélectrique d'indice de réfraction plus élevé que celui de la gaine qui l'entoure (Fig.I.8)⁵¹⁻⁵³. La naissance des capteurs à fibre optique résulte de la rencontre entre deux technologies : la télécommunication et l'optoélectronique.

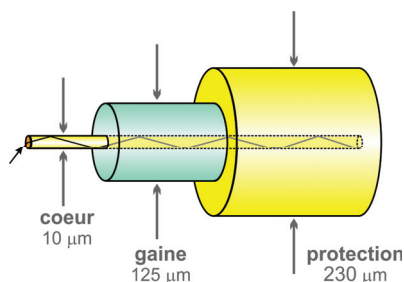


Fig.I.8: Composition d'une fibre optique

Grâce aux développements extraordinaires réalisés ces dernières années dans ces deux domaines (amélioration des performances, diminution des coûts, miniaturisation) cette technique de transduction peut offrir de nouvelles possibilités ainsi que de nombreux avantages :

- la fibre optique présente le plus haut degré de miniaturisation d'un composant optique,
- elle s'affranchit des problèmes liés aux déplacements mécaniques des appareillages traditionnels (ex : prisme pour la SPR...),
- elle permet enfin d'obtenir des mesures dans des endroits peu accessibles ou hostiles et est capable de transporter l'information sur la grandeur mesurée sur une longue distance.

Il faut également mentionner leur inertie chimique, leur compatibilité avec une large gamme de modifications de surface, la disponibilité des lasers bon marché et des photodétecteurs⁵³. Les biocapteurs à fibre optique sont généralement classés en deux catégories⁵¹ :

- Les capteurs intrinsèques : dans ce cas, le biorécepteur est immobilisé sur une surface dénudée de la fibre ou à son extrémité. L'application d'une source excitatrice et la présence de l'analyte à doser vont modifier l'indice de réfraction de la surface et donc faire varier l'intensité lumineuse mesurée,
- Les capteurs extrinsèques : la fibre optique n'intervient que dans le transport de la lumière excitatrice et émise. La distance entre le bioélément et la fibre doit dans ce cas être optimisée avec soin pour assurer une récupération adéquate de la radiation émise⁵⁴.

Interféromètre Mach-Zehnder (MZI)

Ce dispositif de mesure repose sur la comparaison des intensités lumineuses traversant deux branches de guidage dont une seule est fonctionnalisée avec les molécules de bio-reconnaissance. La lumière venant de la source est divisée et réunie grâce à deux jonctions en forme de Y se plaçant juste avant et après ces deux branches (Fig.I.9). Les deux signaux lumineux de sortie se superposent engendrant un phénomène d'interférence. Dans le cas où une modification est provoquée au niveau de la surface sensible, un changement de l'intensité du faisceau lumineux de sortie est enregistré.

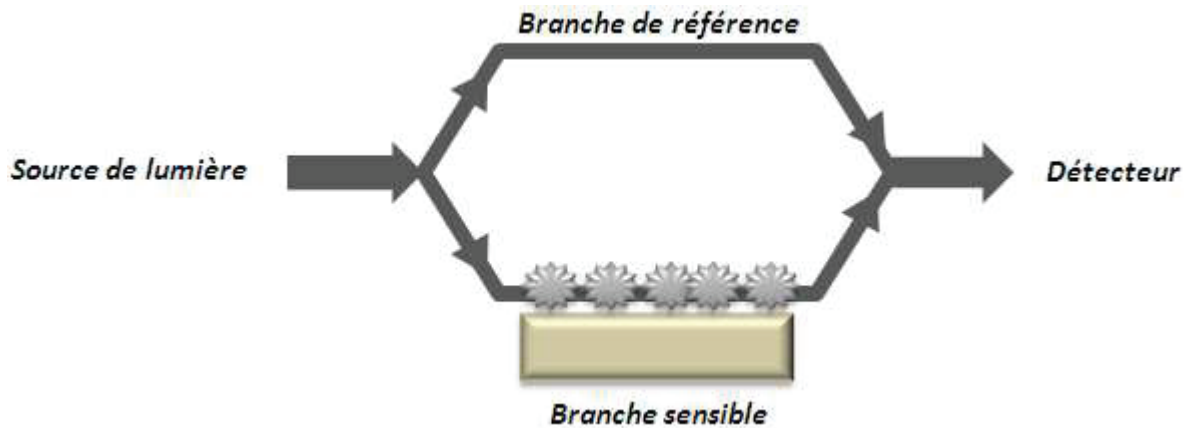


Fig.I.9: Principe d'un interféromètre Mach-Zehnder

La configuration particulière de cet instrument permet de réaliser des mesures interférométriques différentielles, donc d'éliminer le problème des interactions non spécifiques récurrent dans la plupart des biocapteurs. De plus, cette technique est considérée comme très sensible et précise⁵⁵. Elle a été appliquée pour la première fois en 1993 pour l'élaboration d'un immunocapteur à base d'anticorps anti-gonadotropine chorionique humaine⁵⁶, et a fait l'objet par la suite de nombreuses études⁵⁷⁻⁵⁹. Récemment, Melnik *et al*⁶⁰ ont utilisé cette technique pour détecter l'hybridation de l'ADN, après fonctionnalisation de la surface avec de la streptavidine.

Capteurs à résonance plasmonique de surface (SPR)

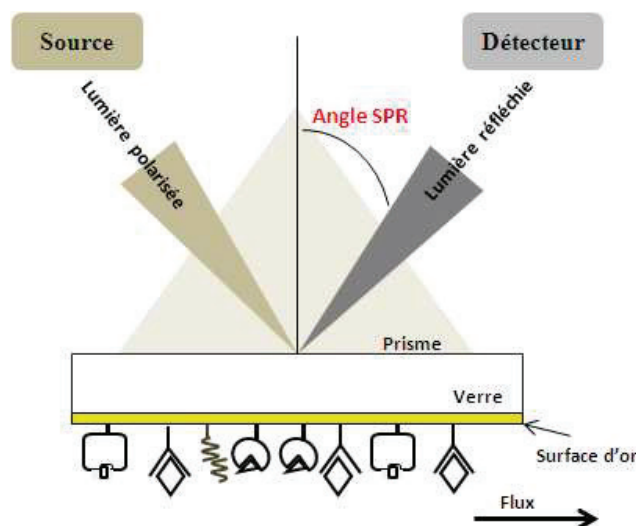


Fig.I.10 : Schéma de principe de la détection SPR

Cette technique analytique est basée sur le principe physique de la résonance plasmonique de surface, c'est-à-dire sur des mesures d'angles de réfraction de la lumière. Une fine couche de métal, riche en électrons, est déposée sur un support solide en verre fixé à la base d'un prisme (Fig.I.10).

Les photons de l'onde évanescente entrent en résonance avec les nuages électroniques du métal (ou plasmon). Le faisceau est réfléchi avec une intensité plus faible et un angle bien défini appelé angle de résonance⁶¹.

Les biocapteurs reposant sur cette technique permettent de mesurer en temps réel, et sans marquage spécifique, les caractéristiques d'interaction entre deux molécules. Pour cela, une des molécules (sonde) est immobilisée sur la surface du biocapteur et l'autre molécule (cible) est injectée (Fig.I.10). Les interactions moléculaires (formation et/ou dissociation des complexes moléculaires) entre le ligand immobilisé sur la surface et l'analyte en solution modifient l'indice de réfraction du milieu et donc l'angle de résonance. La variation de l'angle de résonance est proportionnelle à la quantité d'analyte (Fig.I.11). Cette technique permet d'obtenir des informations sur la cinétique des interactions, l'épaisseur et la masse de la couche déposée ainsi que sur sa surface, et donc sur le nombre de molécules fixées.

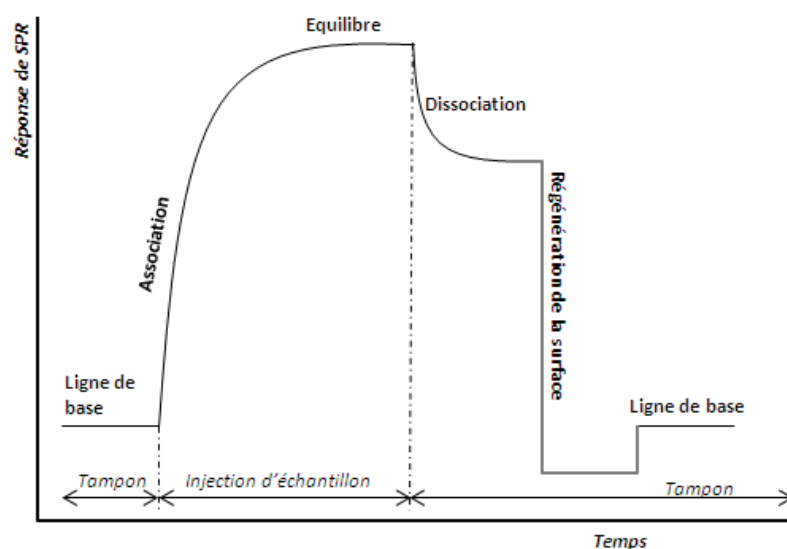


Fig.I.11 : Réponse typique d'un capteur SPR (suivi de l'angle de résonance en fonction du temps)

Au cours des 10 dernières années, les biocapteurs optiques basés sur la détection par SPR ont considérablement évolué et bénéficient maintenant des dernières avancées réalisées dans le domaine de la nanotechnologie⁶². Le NanoSPR est un nouveau biocapteur SPR miniaturisé permettant la détection en temps réel des interactions biomoléculaires sur des nanostructures telles que les nanoparticules métalliques^{63, 64}. Dans l'ensemble, les biocapteurs optiques présentent une bonne implantation dans le monde industriel. En effet, des systèmes basés sur les mesures SPR sont devenus des instruments privilégiés pour la mesure en temps réel de toute interaction biomoléculaire^{11, 12, 18, 65}. La tendance actuelle dans le domaine des biocapteurs optiques est à la conception de systèmes miniaturisés, multiparamétriques et portables^{66, 67}.

Transduction électrochimique

Les biocapteurs électrochimiques peuvent être classés en 4 catégories selon leur mode de détection, à savoir l'ampérométrie, la potentiométrie, la conductimétrie et l'impédimétrie^{33, 68-70}.

Ces techniques électrochimiques nécessitent habituellement :

- une électrode de référence généralement constituée d'un fil d'argent métallique (Ag) revêtue d'une mince couche de chlorure d'argent (AgCl). Cette électrode doit être maintenue à une distance suffisante de la réaction biologique pour pouvoir maintenir un potentiel de référence connu et stable,
- une électrode de travail généralement fabriquée à l'aide de métaux nobles tels que le platine, l'or, ou de carbone graphite pour être chimiquement stable et conductrice,
- et éventuellement, une électrode auxiliaire ou contre-électrode en platine. Son rôle principal est de faire passer le courant à travers le système et non à travers l'électrode de référence, ce qui aurait pour conséquence de modifier son potentiel. Dans le cas des capteurs jetables, la stabilité à long terme de l'électrode de référence n'est pas nécessaire⁶⁹ et la contre-électrode est supprimée de façon à réduire les coûts de production.

Potentiométrie

Le principe des biocapteurs potentiométriques repose sur la mesure du potentiel de charge à une électrode de travail par rapport à une électrode de référence dont le potentiel reste constant (Fig.I.12). La potentiométrie fournit donc des informations sur l'activité des ions mis en jeu lors d'une réaction électrochimique.

La relation entre la concentration d'analyte et le potentiel est régie par l'équation de Nernst :

$$E = E_{Ox/Red}^0 + \frac{RT}{nF} \ln[X] \quad (\text{Eq.I.3})$$

Avec **E** : différence de potentiel qui s'établit, à l'équilibre, à l'interface entre le capteur et la solution de mesure ; **E₀** : potentiel standard de l'ion considéré ; **R** : constante des gaz parfaits ($R = 8,314 \text{ J/(K.mol)}$) ; **T** : température absolue (K) ; **n** : valence des ions ; **F** : constante de Faraday ($F = 96485,309 \text{ C/mol}$) ; **[X]** : concentration de l'analyte.

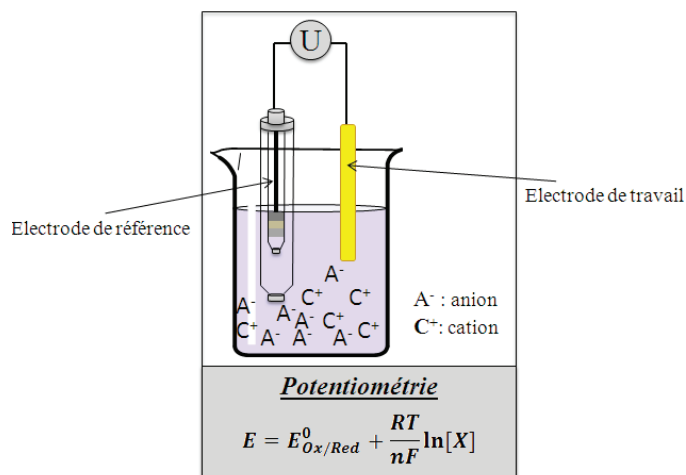


Fig.I.12 : Schéma de principe de la potentiométrie

Les biocapteurs utilisant la potentiométrie comme mode de détection sont très nombreux^{34, 38, 71, 72}. Ils sont réalisées à l'aide de différents types d'électrodes, à savoir les électrodes à membrane sélective aux ions (ISE), les transistors à effet de champ sélectifs aux ions (ISFET) ou plus récemment, les capteurs potentiométriques adressables par lumière (LAPS).

- L'électrode à membrane sélective aux ions (ISE) est une électrode indicatrice capable de mesurer de manière sélective l'activité d'une espèce ionique particulière. Elle comporte une membrane permselective, généralement constituée d'un matériau conducteur ionique. Les différentes stratégies employées pour produire ces électrodes sélectives dépendent principalement de la nature et de la composition du matériau constituant la membrane. Il peut s'agir d'une membrane mince en verre ou d'un matériau polymérique sur laquelle les bioéléments sont immobilisés afin de former un biocapteur qui peut être utilisé dans le domaine de l'environnement^{11, 33} ou de l'analyse biomédicale⁷¹⁻⁷³.
- C'est en 1970 que l'ISFET a été introduit pour la première fois par Bergveld⁷⁴. Il s'agit d'un transistor à effet de champ recouvert d'une membrane sélective aux ions. Depuis, de nombreuses versions et configurations de cet outil ont été développées. Les systèmes à effet de champ, fabriqués selon la technologie des semi-conducteurs, sont d'excellents candidats pour la construction de biocapteurs de par leur haut niveau de pureté dans le design et leur très petite taille⁷⁵, leur temps de réponse très court, leur grande sensibilité et la possibilité de les intégrer sur une puce⁷⁶. La plupart des applications des biocapteurs FET reposent sur la détection des changements de pH induits par le processus de reconnaissance à l'aide d'une couche isolante sensible aux H^+ tels que Si_3N_4 ⁷⁷⁻⁷⁹. Ainsi des travaux ont permis la détection d'un large choix d'analytes avec des ISFETs à base de récepteurs olfactifs¹¹ ou d'enzymes⁸⁰, ou encore celles d'agents biologiquement actifs à l'aide de biocapteurs microbiens^{33, 77, 80}.

Certains ont également utilisé ces transducteurs à effet de champ pour la détection de l'ADN^{80, 81}.

- Les LAPSs (light addressable potentiometric sensors) sont d'autres types de transducteurs à effet de champ. Leur principe repose sur l'activation du transducteur par une diode électroluminescente (LED). L'illumination à l'aide d'une source d'intensité modulée génère un photocurrent qui dépend du potentiel appliqué^{69, 82}. Ce type de biocapteur est très apprécié dans le domaine biomédical, environnemental^{11, 33} et agroalimentaire⁴⁷.

Ampérométrie et voltammétrie

A l'inverse de la potentiométrie, l'ampérométrie et la voltammétrie sont basées sur la mesure du courant électrique produit lorsqu'un potentiel est appliqué entre une électrode de référence et une électrode de travail. Le courant mesuré est le résultat du processus de réduction ou d'oxydation électrochimique d'une espèce électroactive produite lors d'une réaction biochimique ayant lieu à l'électrode de travail (Fig.I.13).

On parle d'ampérométrie lorsque le courant est mesuré à un potentiel constant et de voltammétrie lorsque la mesure est réalisée lors d'une variation contrôlée de potentiel⁷⁰. La réponse en courant est alors un pic ou un plateau proportionnel à la concentration de l'analyte dans le milieu (Eq.I.4). Les méthodes voltamétriques les plus connues comprennent la voltammétrie à balayage linéaire, la voltammétrie cyclique, à impulsion différentielle, à onde carrée, la voltampérométrie ou la polarographie^{68, 70}.

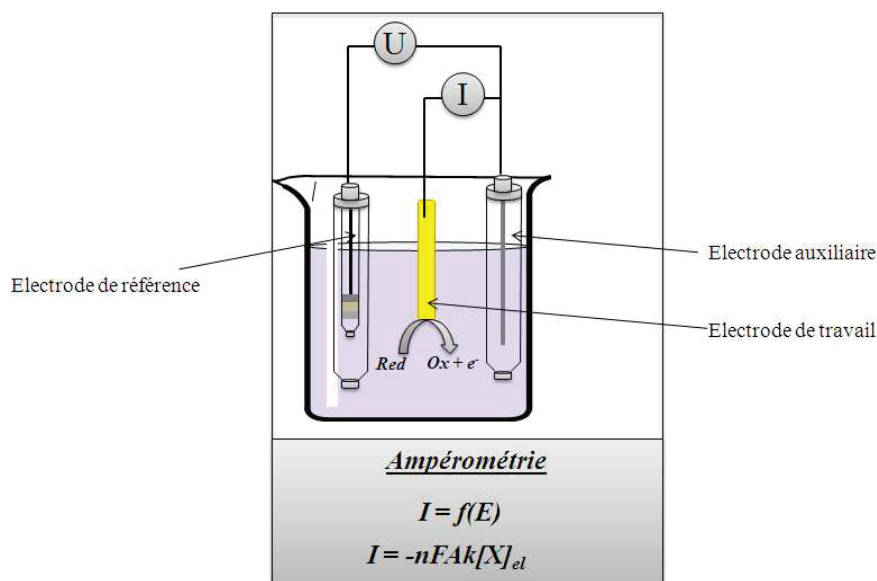


Fig.I.13 : Schéma de principe de la voltammétrie

L'avantage en travaillant à potentiel fixe est que le courant nécessaire pour appliquer le potentiel au système reste négligeable. Ceci permet de minimiser le bruit de fond, et donc d'améliorer la limite de détection. De plus, le fait de ne pas travailler sur une gamme de potentiel mais sur une valeur fixe permet d'augmenter la sélectivité du système, la valeur du potentiel étant généralement celle qui caractérise l'espèce⁶⁹.

$$I = -nFAk[X]_{el} \quad (\text{Eq.I.4})$$

Avec **n** : valence d'ion ; **F** : constante de Faraday ($F = 96485,309 \text{ C/mol}$) ; **A** : surface de l'électrode (cm^2) ; **k** : coefficient de diffusion ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) ; $[X]_{el}$: concentration en analyte à électrode

L'ampérométrie est l'un des modes de transduction électrochimique les plus utilisés dans le domaine des biocapteurs. Cette technique présente l'avantage d'être très sensible, peu coûteuse et d'offrir une grande rapidité de réponse. Comparé au biocapteur potentiométrique, le biocapteur ampérométrique peut être plus intéressant en raison de sa haute sensibilité et sa large gamme linéaire⁸². Cependant, toutes les biomolécules n'étant pas capables de servir de partenaires d'oxydo-réduction dans les réactions électrochimiques, des médiateurs doivent souvent être utilisés. Malgré cet inconvénient, les dispositifs ampérométriques sont généralement plus sensibles que les systèmes potentiométriques⁶⁹. Différents médiateurs ont été proposés comme le ferrocène, les quinones, les colorants et les viologènes⁸³. Ces médiateurs peuvent être ajoutés en solution ou co-immobilisés avec le biorécepteur sur la surface de l'électrode (Fig.I.14).

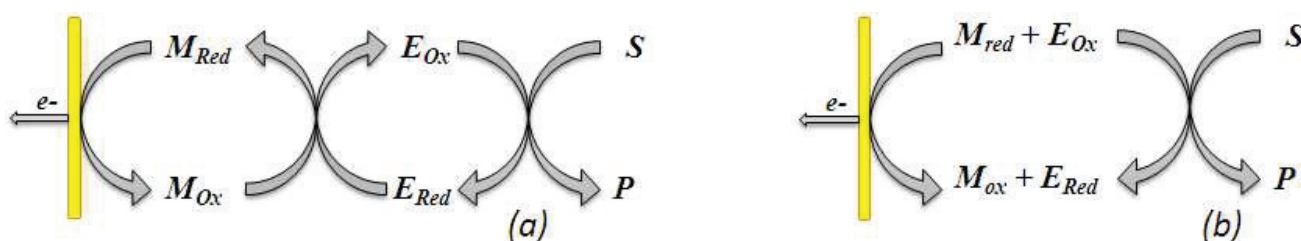


Fig.I.14: Schéma de principe d'un biocapteur enzymatique ampérométrique en présence d'un médiateur en solution (a) et co-immobilisé avec l'enzyme sur l'électrode (b)

La co-immobilisation de l'enzyme et du médiateur peut être accomplie par immobilisation successive du médiateur et de l'enzyme ou par immobilisation du mélange. L'avantage d'une telle approche est que ni l'enzyme ni le médiateur ne doivent être ajoutés dans le milieu de mesure, ce qui facilite la réalisation des mesures.

Des biocapteurs ampérométriques ont été développés pour la détection d'une large gamme de molécules d'intérêt en utilisant différents éléments de reconnaissance tels que les bactéries ou les algues^{33, 34}, les enzymes³⁸, l'ADN¹⁶ ou les anticorps¹⁵.

Impédancemétrie

La première publication de spectroscopie d'impédance électrochimique remonte à 1975⁷⁰. En appliquant une petite variation de potentiel sinusoïdale (U), il est possible de mesurer le courant (I) résultant (Fig.1.15). En faisant varier la fréquence d'excitation (f) du potentiel appliqué, on peut calculer l'impédance complexe électrochimique, $Z(\omega)$, somme des composantes réelles et imaginaires (Eq.I.5).

$$Z(\omega) = \frac{U(\omega)}{I(\omega)} = Z_r(\omega) + Z_i(\omega) \text{ et } \omega = 2\pi f \quad (\text{Eq.I.5})$$

Avec Z_r : impédance réelle ; Z_i : impédance imaginaire, U : potentiel sinusoïdal ; I : courant sinusoïdal résultant ; f : fréquence d'excitation

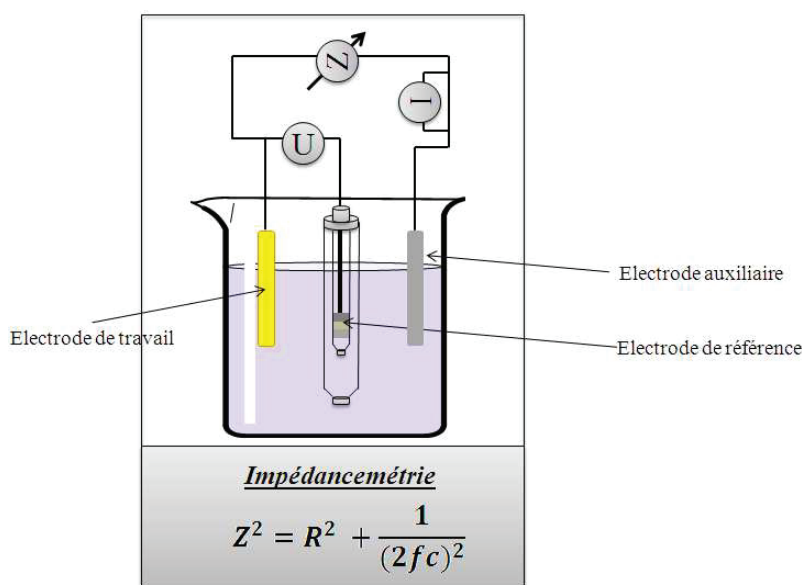


Fig.I.15 : Schéma de principe de l'impédancemétrie

La spectroscopie d'impédance électrochimique est une méthode voltampérométrique qui se distingue des méthodes précédemment décrites pour deux raisons:

- Le potentiel de l'électrode imposé n'est plus continu mais sinusoïdal de faible amplitude (quelques mV).
- L'analyse de la réponse du courant (I) se fait en fonction de la fréquence f .

La spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) est une excellente technique pour étudier les propriétés électriques à l'interface électrode/électrolyte⁸⁴. Les différents processus pouvant y avoir lieu peuvent être distingués en fonction de la fréquence appliquée. A hautes fréquences ont lieu des processus rapides tels que les transferts d'électrons tandis que les transferts de masses ou la diffusion s'observent à basses fréquences (Fig.I.16).

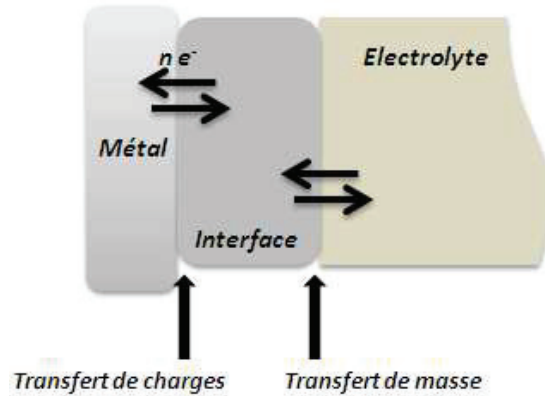


Fig.I.16 : Différents processus électrochimiques à l'interface métal/électrolyte

Il existe deux modes classiques de représentation des résultats obtenus en impédimétrie :

- La représentation de Bode (Fig.I.17) : le module $|Z|$ et la phase ϕ de l'impédance complexe sont représentés en fonction du logarithme de la fréquence angulaire.

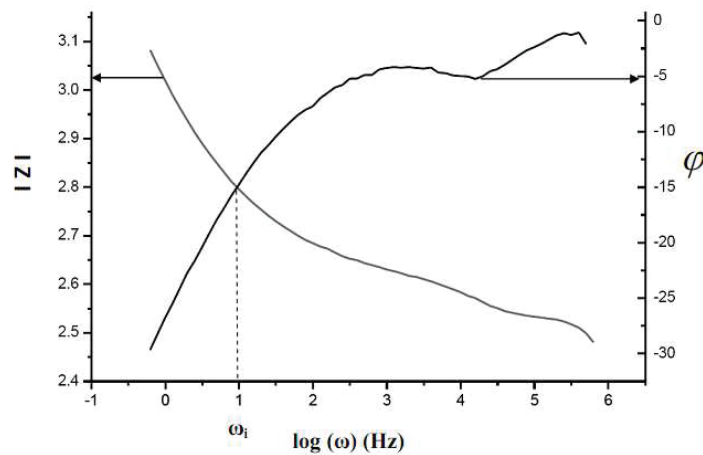


Fig.I.17 : Diagramme de Bode

- La représentation de Nyquist (Fig.I.18) : il s'agit de la courbe $-Z_{im}$ (partie imaginaire de Z) en fonction de Z_{re} (partie réelle) paramétrée en fréquence angulaire (ω).

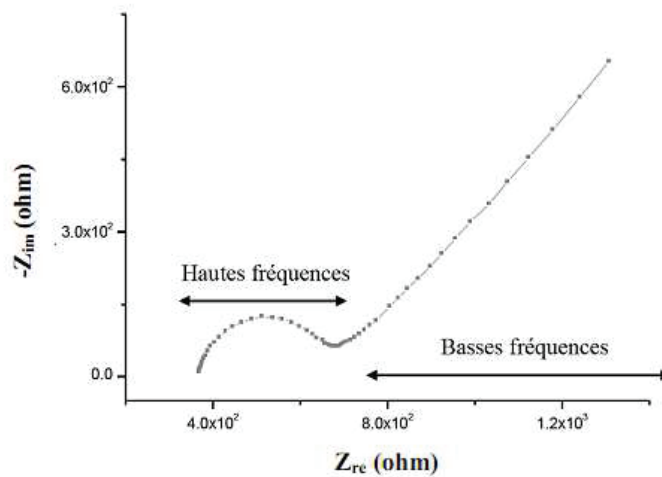


Fig.I.18 : Représentation de Nyquist

❖ Impédance électrochimique du système métal-solution - Modélisation

Une cellule électrochimique, étudiée par spectroscopie d'impédance, peut être représentée par un circuit électrique équivalent comprenant les éléments simples suivants:

- les résistances R qui sont indépendantes de la fréquence et qui ne produisent aucun déphasage. L'impédance Z_R d'une résistance est égale à la résistance R ($Z_R = R$),
- les capacités C qui déphasent le signal. L'impédance correspondante Z_C , diminuant avec la fréquence ($Z_C = 1/j\omega C$),
- les inductances L qui déphasent le signal. Dans ce cas, l'impédance Z_L augmente avec la fréquence et correspond à $Z_L = j\omega L$.

Le calcul de l'impédance totale Z dépend de la nature du circuit. Lorsque les éléments sont en série, l'impédance totale est égale à la somme des impédances de chaque élément

$$Z = \sum_i Z_i$$

Lorsqu'elles sont en parallèle :

$$\frac{1}{Z} = \sum_i \frac{1}{Z_i}$$

De nombreux diagrammes impédancemétriques peuvent être modélisés par un circuit électrique équivalent comprenant uniquement des résistances et des capacités. Le modèle de Randles (Fig.I.19) est le circuit le plus couramment utilisé pour décrire une cellule électrochimique. Il combine quatre éléments, la résistance de l'électrolyte (R_s), la capacité de double couche (C_{dc}), la résistance de transfert de charge (R_{tc}) et l'impédance de Warburg Z_W .

- R_s est la résistance série, elle correspond à la résistance de l'électrolyte entre l'électrode de travail et l'électrode de référence et à la résistance des contacts.
- Quand une électrode métallique est plongée dans un électrolyte dans lequel les charges sont transportées par le mouvement des ions, une interface électrique se forme rapidement. Un potentiel est généré du fait de la distribution hétérogène des charges à cette interface. La double couche de charges à l'interface (une couche située côté métal, la seconde de charge égale et opposée côté électrolyte) se comporte comme un condensateur plat. Cette capacité d'interface est appelée capacité de double couche, C_{dc} . Elle est généralement de l'ordre de 10-20 $\mu F/cm^2$ ⁸⁵. Le caractère non parfait de cette capacité traduit le caractère rugueux de la surface de l'électrode. La capacité est dite non parfaite ou CPE (Constant Phase Element).

L'impédance de la capacité non parfaite de double couche Q_{dc} est donnée par la relation I.6 pour laquelle $0,5 < n < 1$ traduit la rugosité de la surface

$$Z_{Q_{dc}} = \frac{(j\omega)^{-n}}{C} \quad (\text{Eq.I.6})$$

- Cependant, quelques charges fuient à travers la double couche sous l'effet des réactions électrochimiques qui ont lieu. Une telle fuite de charges induit une résistance dite de transfert de charge, R_{tc} dont l'expression est dérivée de l'équation de Butler-Volmer. Pour de petites amplitudes de signal appliquées, elle est donnée par :

$$R_{tc} = \frac{RT}{nFi_0} \quad (\text{Eq.I.7})$$

Avec R : constante des gaz parfaits ($\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) ; T : température (K) ; F : constante de Faraday ($F = 96485,309 \text{ C/mol}$) ; n : nombre d'électrons impliqués dans la réaction au contact de l'électrode ; i_0 : densité du courant de transfert.

- L'impédance de Warburg (Z_w) ou impédance de diffusion traduit l'influence du transport de matière de l'espèce électroactive de l'électrolyte vers l'électrode

$$Z_w = \frac{\Delta E}{\Delta I} = \frac{RT}{C_B n^2 F^2 A (j\omega D)^{1/2}} \quad (\text{Eq.I.8})$$

Avec Z_w : impédance de Warburg ; R : constante des gaz parfaits ($\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) ; T : température (K) ; C_B : concentration de l'espèce électrolysée au sein de la solution (mol.cm^{-3}) ; F : constante de Faraday ($F = 96485,309 \text{ C/mol}$) ; n : nombre d'électrons impliqués dans la réaction au contact de l'électrode ; A_0 : surface active (cm^2) ; D : coefficient de diffusion de l'espèce ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$) ; ω : fréquence angulaire (s^{-1}).

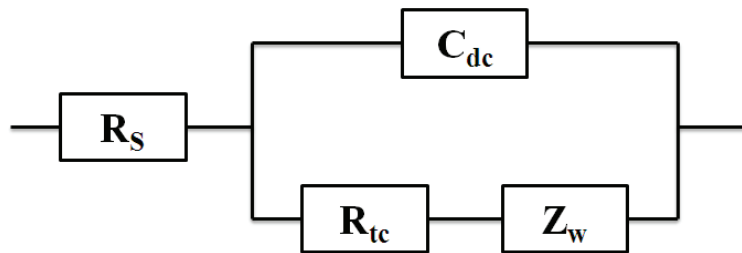


Fig.I.19 : Circuit électrique de Randles

La diffusion et le transfert de charge sont des processus faradiques puisqu'ils obéissent à la loi de Faraday tandis que le chargement de la capacité de la double couche est un processus non faradique.

A une fréquence de mesure supérieure à 10 Hz, l'impédance de diffusion (Z_W) peut être négligée et l'impédance totale du système est constituée principalement de la résistance de la solution (R_S), la capacité de double couche (C_{dc}), et la résistance de transfert de charge (R_{tc}).

Dans cette configuration, les diagrammes de Nyquist et de Bode permettent de remonter aux valeurs des différents composants du circuit. Comme le montre le diagramme de Nyquist présenté sur la figure I.20, les valeurs de R_S et R_{tc} peuvent être déduites de la courbe tandis que C_{dc} nécessite un calcul.

- R_S (Ω) correspond à l'abscisse du premier point du demi-cercle.
- R_{tc} (Ω) correspond au diamètre du demi-cercle.
- C_{dc} (F) se calcule à partir de la valeur de la fréquence au plus haut point du demi-cercle f_0

$$f_0 = \frac{1}{(R_{tc} C_{dc})^n} \quad (\text{Eq.I.9})$$

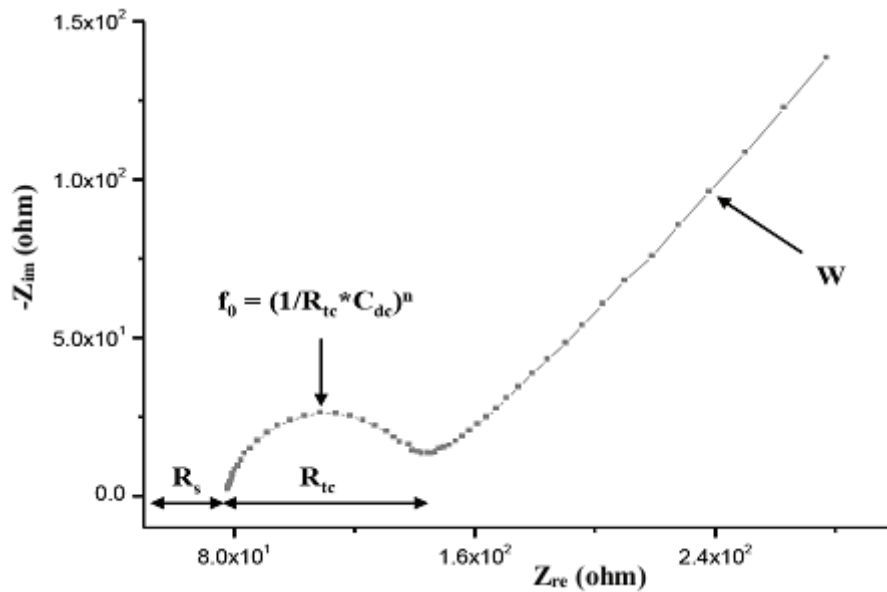


Fig.I.20 : Calcul des différents composants du circuit de Randles à partir du diagramme de Nyquist

Tandis que les valeurs précédentes proviennent de l'analyse du diagramme de Nyquist, l'impédance de Warburg (W) est calculée par :

$$W = \frac{1}{\sqrt{\omega_i}} \quad (\text{Eq.I.10})$$

ω_i étant la fréquence au point d'intersection des diagrammes de phase et d'impédance comme l'illustre la figure I.17.

Cette analyse n'est valable que pour le modèle de Randles qui n'est applicable que pour une électrode simple mais ne prend pas en compte la présence d'un film adsorbé à la surface. Dans le cas

de modèles plus sophistiqués, la modélisation mène à des circuits électriques équivalents plus complexes. La détermination de la valeur des composants constituant le circuit équivalent est réalisée à l'aide de logiciels (ex : Zview 2). Il est important de noter que les circuits électriques équivalents dessinés pour une cellule électrochimique ne sont pas uniques, notamment pour des processus complexes.

On observe actuellement de plus en plus de travaux publiés sur les biocapteurs impédimétriques⁸⁶. C'est une technique non invasive qui ne requiert pas d'instrumentation complexe permettant des applications courantes en laboratoire. Il est possible d'employer cette technique non seulement pour caractériser le comportement et les propriétés des différentes couches immobilisées à la surface du biocapteur, mais également comme un moyen de transduction pour la détection de molécules cibles^{10-12, 33, 47, 87}. Il est également possible de le coupler à une autre technique de détection électrochimique afin d'obtenir des informations sur les mécanismes mis en jeu⁸⁸.

Conductimétrie

La conductimétrie est une technique de mesure électrochimique alternative aux techniques précédentes. Son principe repose sur la mesure de la conductivité électrique d'une solution électrolytique contenant des charges électriques mobiles, constituées par l'ensemble des ions⁸⁹.

Lorsqu'on applique une différence de potentiel (U) entre deux électrodes immergées dans une solution conductrice, on observe le passage d'un courant (I) provenant du mouvement des ions constituant l'électrolyte (Fig.I.21).

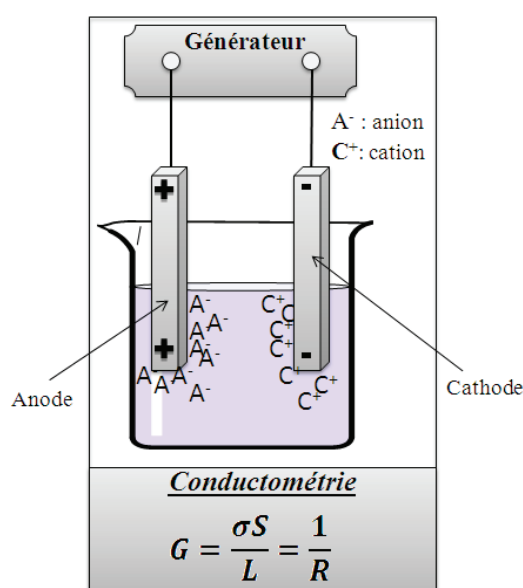


Fig.I.21: Schéma de principe de la conductimétrie

La conductance (G) qui représente cette capacité à laisser passer le courant est l'inverse de la résistance (R). Elle peut s'exprimer en fonction de I et de U , grâce à la loi d'Ohm (Eq.I.11).

$$G = \frac{1}{R} = \frac{I}{U} \quad (\text{Eq.I.11})$$

La conductivité (σ) est également une propriété intrinsèque à la solution, inverse de la résistivité, qui est reliée à la conductance par la formule suivante (Eq.I.12)

$$\sigma = G \times \frac{L}{S} \quad (\text{Eq.I.12})$$

Avec S : surfaces des électrodes (m^2) ; L : distance entre les électrodes (m) ; G et σ étant exprimés en S et S.m^{-1} respectivement.

La grandeur L/S est appelé constante de la cellule. La conductivité dépend de la nature des ions présents dans la solution (leur charge et leur mobilité) et de leurs concentrations. La température est également un facteur jouant sur la conductivité. Cette dernière augmente avec la température.

La mobilité des porteurs de charge est une notion utilisée en physique pour caractériser les milieux conducteurs du courant électrique. Elle est notée μ_i et relie la vitesse moyenne d'un ion i du milieu (v_i) au champ électrique (E) qu'il subit via la relation :

$$v_i = \mu_i E \quad (\text{Eq.I.13})$$

Avec v_i : vitesse moyenne d'un ion (cm/s) ; μ_i : mobilité d'un ion ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}.\text{V}^{-1}$) ; E : intensité du champ électrique (V.cm^{-1})⁹¹

La conductivité globale du milieu peut alors s'exprimer en fonction de la mobilité des ions présents, de leur charge et de leur concentration selon l'équation suivante (Eq.I.14) :

$$\sigma = F \sum_i |z_i| \mu_i C_i \quad (\text{Eq.I.14})$$

Avec σ : conductivité (S.m^{-1}) ; z_i : charge de l'ion ; μ_i : mobilité de l'ion ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}.\text{V}^{-1}$) ; C_i : concentration de l'ion (mol.cm^{-3}) ; F : constante Faraday ($F = 96485,309 \text{ C/mol}$).

Dans le cas où la solution est un mélange de plusieurs ions mono ou polychargés, via l'équation I.15, la conductivité peut être déterminée à partir des conductivités molaires ioniques λ_i des ions qui composent cette solution (Tab. I.1) ainsi que de leur concentration C_i et le nombre de charges z_i portées par l'ion, indépendamment de leur signe.

$$\sigma = \sum |z_i| \lambda_i [C]_i \quad (\text{Eq.I.15})$$

Avec σ : conductivité (S.m^{-1}) ; C_i : concentration de l'ion i (mol.m^{-3}) ; z_i : nombre de charges de l'ion i ; λ_i : conductivité molaire de l'ion i ($\text{S.m}^2.\text{mol}^{-1}$).

Afin de pouvoir comparer les conductivités de différentes solutions, on fait souvent appel à une grandeur appelée conductivité molaire (ou parfois conductivité équivalente) Λ . Celle-ci est définie comme étant la conductivité de la solution rapportée à la concentration ionique totale :

$$\Lambda = \frac{\sigma}{C} \quad (\text{Eq.I.16})$$

Avec σ : conductivité d'une solution (S.m^{-1}) ; C : concentration totale (mol.m^{-3}) ; Λ : conductivité molaire ($\text{S.m}^2.\text{mol}^{-1}$).

Dans les cas des électrolytes forts, tels que les sels, les acides forts et les bases fortes, la conductivité molaire n'est que faiblement dépendante de la concentration et exprimé suivant la relation suivante :

$$\Lambda = \Lambda^0 - K\sqrt{C} \quad (\text{Eq.I.17})$$

Avec Λ : conductivité molaire ($\text{S.m}^2.\text{mol}^{-1}$) ; Λ^0 : conductivité molaire à dilution infinie (ou conductivité molaire limite) ($\text{S.m}^2.\text{mol}^{-1}$) ; C : concentration totale (mol.m^{-3}) ; K : coefficient de Kohlrausch qui dépend principalement du type de l'électrolyte plutôt que de son identité chimique spécifique⁹⁰.

Λ^0 peut être exprimée comme la somme des contributions indépendantes des cations et anions constitutifs (loi de Kohlrausch) :

$$\Lambda^0 = \nu^+ \lambda_i + \nu^- \lambda_i \quad (\text{Eq.I.18})$$

Avec Λ^0 : conductivité molaire à dilution infinie (ou conductivité molaire limite) ($\text{S.m}^2.\text{mol}^{-1}$) ; ν^+ et ν^- : coefficients stœchiométriques pour le cation et l'anion de l'électrolyte respectivement et λ_i : conductivité molaire ionique ($\text{S.m}^2.\text{mol}^{-1}$).

<i>Ions</i>	$\lambda_i (S.m^2.mol^{-1})$	<i>Ions</i>	$\lambda_i (S.m^2.mol^{-1})$	<i>Ions</i>	$\lambda_i (S.m^2.mol^{-1})$
H ₂ PO ₄ ⁻	3,6	H ₂ PO ₂ ⁻	4,6	Br ₃ ⁻	4,3
Li ⁺	3,866	1/2Ni ²⁺	4,96	IO ₃ ⁻	4,05
Na ⁺	5,008	ClO ₂ ⁻	5,2	HCO ₃ ⁻	4,45
HSO ₄ ⁻	5,2	1/2Zn ²⁺	5,28	NH ₂ SO ₃ ⁻	4,83
IO ₄ ⁻	5,45	1/2Mg ²⁺	5,3	HSO ₃ ⁻	5,8
F ⁻	5,54	1/2Mn ²⁺	5,35	1/3Al ³⁺	6,1
BrO ₃ ⁻	5,57	1/2Cu ²⁺	5,36	ClO ₃ ⁻	6,46
MnO ₄ ⁻	6,13	1/2Fe ²⁺	5,4	1/3Fe ³⁺	6,8
Ag ⁺	6,19	1/2HPO ₄ ²⁻	5,7	1/3Ce ³⁺	6,98
HS ⁻	6,5	1/2Ca ²⁺	5,947	1/3PO ₄ ³⁻	9,28
SCN ⁻	6,6	1/2CO ₃ ²⁻	6,93	1/3[Fe(CN) ₆] ³⁻	10,09
ClO ₄ ⁻	6,73	NO ₂ ⁻	7,18	1/4[Fe(CN) ₆] ⁴⁻	11,04
NO ₃ ⁻	7,142	1/2SO ₃ ²⁻	7,2		
K ⁺	7,348	HF ₂ ⁻	7,5		
NH ₄ ⁺	7,35	1/2SO ₄ ²⁻	8		
Cl ⁻	7,631	1/2S ₂ O ₃ ²⁻	8,5		
I ⁻	7,68				
CN ⁻	7,8				
Br ⁻	7,81				
OH ⁻	19,8				
H ⁺	34,965				

Tableau I.1 : Valeurs de la conductivité molaire ionique (λ_i) de certains ions à 25°C

La transduction conductimétrique, comparée aux autres techniques, a été relativement peu utilisée pour la mise au point de biocapteurs⁹¹. Même si la détection de la conductance en solution n'est pas spécifique, les mesures conductimétriques peuvent être extrêmement sensibles grâce aux éléments biologiques fixés sur la surface des transducteurs.

Depuis quelques années, on assiste à un intérêt croissant pour les biocapteurs conductimétriques étant donné le nombre d'avantages qu'ils offrent⁸⁹ :

- pas de nécessité d'électrode de référence,
- utilisation de tensions alternatives de faible amplitude, ce qui permet d'éviter les processus faradiques d'électrode,
- insensibilité à la lumière,
- possibilités de miniaturisation.

Le paramètre mesuré est la conductance électrique de la membrane biologique immobilisée sur le transducteur qui varie lorsque le processus de reconnaissance biologique mise en œuvre au niveau du capteur génère des espèces chargées.

Les biorécepteurs sont le plus souvent des enzymes^{69, 70, 89}. Cependant depuis les années 2000, d'autres entités biologiques commencent à être utilisées. Ainsi, des biocapteurs conductimétriques à base d'algues ont été proposés pour la détection de composés toxiques (métaux lourds, pesticides) dans l'eau. Un biocapteur à bactéries a été récemment développé pour la détection du trichloroéthylène³³. Les immunocapteurs ou les capteurs à ADN conductimétriques commencent également à attirer l'attention des chercheurs en vue de créer de nouvelles techniques de diagnostic clinique simples et rapides. Phuong *et al*⁹² ont par exemple immobilisé de l'ADN sur des électrodes interdigitées pour la détection du virus de l'herpès tandis que des anticorps ont permis la détection d'*E.coli*⁹³ ou la réalisation de tests immunologiques pour l'hépatite B⁹⁴.

I.2 Les transducteurs électrochimiques

I.2.1 Généralités et nouvelles tendances

Les transducteurs électrochimiques diffèrent par la nature du matériau qui constitue l'électrode ou son substrat, la taille ou la géométrie de l'électrode, ou encore la technique de fabrication utilisée^{95, 96}.

Les électrodes de travail doivent être à la fois conductrices et chimiquement stables. Elles sont donc généralement constituées de métal noble (or, argent ou platine) ou de carbone (graphite), tandis que le substrat servant de support est dans la plupart des cas constitué de céramique, de verre ou de silicium. Cependant, de nouveaux matériaux ont été introduits ces dernières années, permettant d'améliorer de manière sensible les performances des capteurs. Ainsi, le carbone diamant dopé au bore est apparu comme un matériau d'électrode extrêmement prometteur. Il offre une fenêtre de potentiel plus large que les matériaux classiques, une grande stabilité, un faible courant de fond et une grande inertie chimique⁹⁷. L'utilisation de nanomatériaux (nanoparticules métalliques, nanotubes de carbone, graphène,...), dont nous parlerons dans le paragraphe I.4.1.3., est également en plein essor. De la même façon, les matériaux souples tels que le polyimide, le polyéthylène naphthalate ou téréphtalate ou le polytétrafluoréthylène, utilisés depuis longtemps dans l'industrie électronique, ont fait leur apparition dans le domaine des capteurs. Leur plasticité intrinsèque, leur hydrophobie, leurs excellentes propriétés diélectriques et isolantes ainsi que leur forte stabilité thermique en font des substrats de choix pour la fabrication d'électrodes en vue d'applications très variées. Une revue très récente a par exemple été consacrée à leur utilisation dans l'industrie textile⁹⁸.

Enfin, les progrès technologiques énormes réalisés ces dernières années dans le domaine des techniques de microfabrication ont rendu possible la réalisation de microélectrodes de tailles et de géométries variées intégrables dans des systèmes miniaturisés pour la détection simultanée multiparamétrique. Leur petite taille est un atout pour le développement de systèmes analytiques portables. Ces microélectrodes, fabriquées par des techniques lithographiques ou par sérigraphie, offrent de nombreux avantages par rapport aux macroélectrodes de taille conventionnelles^{96, 98, 99}. En effet, elles permettent de diminuer la quantité de matériel biologique utilisé, conduisent à de meilleures sensibilités et à des temps d'analyse plus faibles en raison d'une réduction des effets de transport macro-cinétiques.

La technique de sérigraphie (« thick-film technology ») consiste à déposer directement sur le support des couches d'encres conductrices selon divers motifs géométriques. Cette méthode permet de déposer l'encre sur des surfaces de plusieurs m² avec une résolution latérale de 50 µm. Elle est largement utilisée pour la fabrication à grande échelle de capteur jetables et à faible coût. Un grand nombre d'électrodes sérigraphiées (« screen-printed electrodes ») sont à présent disponibles commercialement et de nombreux laboratoires possèdent leur propre matériel de fabrication^{100, 101}. Cependant, la technique de sérigraphie ne permet pas de réaliser des structures microniques ou submicroniques. Il est dans ce cas nécessaire de faire appel à d'autres techniques.

Les techniques de microfabrication (« thin-film technology ») sont issues de la technologie des semi-conducteurs et peuvent être combinées à des étapes de micromachining pour l'élaboration de structures mécaniques tridimensionnelles⁹⁶. La première étape consiste en un dépôt chimique (CVD, « chemical vapor deposition ») ou physique (PVD, « physical vapor deposition ») de métaux ou de couches diélectriques (typiquement oxyde ou nitrure de silicium) sur le substrat. Le procédé de photolithographie consiste à déposer par spin-coating ou spray-coating un polymère photostructurable. Dans ce cas, la couche photosensible est ensuite exposée à des rayonnements UV au travers du masque dans lequel est reproduit l'ensemble du motif que l'on souhaite transférer sur le substrat. Les résines positives vont être dégradées tandis que les résines négatives vont réticuler sous irradiation, laissant des structures saillantes ou en creux après développement. La structuration du film mince peut ensuite être réalisée par transfert positif en utilisant la technique « lift-off » (dépôt du métal souhaité suivi de la dissolution de la résine sensible) ou la lithographie douce (« micro-contact printing »). Une autre approche consiste à effectuer un transfert négatif (gravure sèche ou humide)⁹⁶.

Les microélectrodes réalisées selon les techniques décrites précédemment peuvent être de tailles et de géométries variées. Elles peuvent être intégrées en réseaux sur une même puce pour permettre la détection de plusieurs analytes à la fois. Parmi les différentes géométries possibles, les

microélectrodes interdigitées (IDMs) semblent les plus prometteuses car elles offrent de nombreux avantages, parmi lesquels on peut mentionner la faible chute ohmique du potentiel, une atteinte rapide du signal à l'équilibre et l'augmentation du rapport de signal-sur-bruit (S/N). Aucune électrode de référence n'est par ailleurs nécessaire^{102, 103}.

I.2.2 Les microélectrodes interdigitées

Comme on peut le voir sur la figure I.22, les IDMs sont constituées de microbandes parallèles alternativement interconnectées, formant une structure en peignes interpénétrés, un peigne servant d'anode et le deuxième de cathode. Les bandes ont généralement quelques dizaines de microns d'épaisseur et sont séparées par quelques microns. Ceci permet que l'espèce générée sur l'une des bandes soit re-consommée à la bande suivante (Fig.I.23).

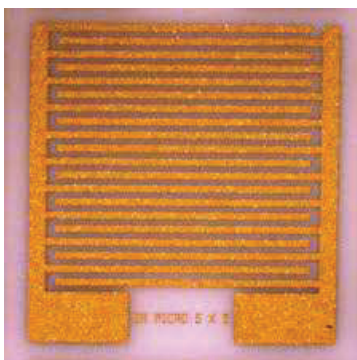


Fig.I.22 : Structure en bandes parallèles des électrodes interdigitées

L'efficacité de ce procédé de recyclage dépend de la largeur de l'électrode et de la distance entre les électrodes voisines, car lorsque cette dernière augmente, la probabilité de diffusion de la molécule dans la solution plutôt qu'à une électrode adjacente augmente également.

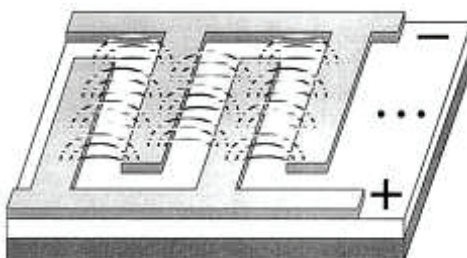


Fig.I.23 : Illustration du procédé de recyclage des espèces redox des électrodes interdigitées¹⁰⁴

Les microélectrodes interdigitées peuvent être de formes très variées (planes, annulaires, mailles 3D, serpentins) selon l'application envisagée^{102, 105}. Leurs performances dépendent de

différents paramètres tels que leur géométrie (nombre, longueur, largeur et épaisseur des doigts, distance inter-doigts) ou le matériau dont elles sont constituées^{102, 103}. Les dimensions typiques sont de 1 à 20 μm pour la largeur ; 2 à 10 mm pour la longueur, 0,1 à 0,2 μm pour la hauteur et 1 à 20 μm pour la distance inter-bandes. Le nombre de bandes n'a pas d'influence significative sur le rapport signal-sur-bruit (S/N), le bruit de fond (proportionnel à la surface des électrodes seules) augmentant de la même manière que le signal (proportionnel à la surface totale). Par contre, S et S/N croissent lorsqu'on diminue la largeur des doigts, la diffusion des espèces électroactives étant radiale. Les performances des IDMs ont par ailleurs été évaluées pour différentes valeurs de l'espace interdigitial. De manière générale, la proximité des électrodes augmente la sensibilité et diminue le temps de réponse car elle permet d'améliorer l'efficacité du cycle rédox. Dans les dispositifs où l'espace est inférieur à 800 nm, l'efficacité du cycle est d'environ 40. Enfin, la hauteur des microbandes influence à la fois le signal et le rapport signal/bruit, ce dernier passant par un maximum. Un grand nombre de biocapteurs utilisant des microélectrodes interdigitées ont été proposés dans la littérature. Les électrodes sont généralement en or^{89, 106-108}, dans certains cas en platine^{105, 109}, les substrats les plus utilisés ces dernières années étant des polymères flexibles¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

I.2.3 Modèle de circuit équivalent des électrodes interdigitées avec biomembrane

Comme nous le verrons plus en détail dans le chapitre suivant, les transducteurs conductimétriques utilisés dans notre travail sont constitués de deux électrodes interdigitées, l'une servant d'électrode de travail, sur laquelle est immobilisée le biorécepteur, et l'autre de référence. Le comportement des électrodes peut être modélisé par le circuit électrochimique équivalent présenté ci-après (Fig.I.24).

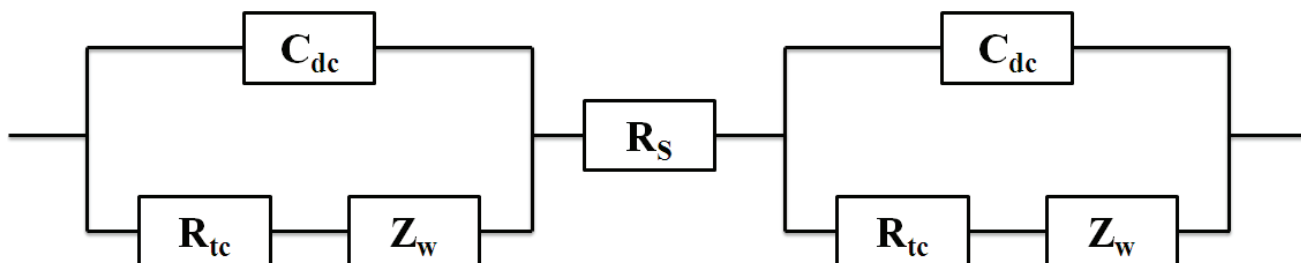


Fig.I.24: Modèle de circuit équivalent au transducteur conductimétrique à deux électrodes interdigitées utilisé dans ce travail

Cependant, à des fréquences supérieures à 10 kHz, l'impédance de diffusion Z_w peut être négligée et l'impédance totale du système consiste principalement en la résistance de la solution d'électrolyte R_s , la capacité de la double couche C_{dc} et la résistance de transfert de charge R_{tc} . Etant

donné que notre système de mesure travaille à 100 kHz, le modèle ci-dessous convient parfaitement à notre système (Fig.I.25).

L'impédance totale du système peut être décomposée par :

$$\mathbf{Z} = \mathbf{Z}_r + \mathbf{Z}_c \quad (\text{Eq.I.19})$$

Avec \mathbf{Z}_r : composante résistive de l'impédance ; \mathbf{Z}_c : composante capacitive de l'impédance

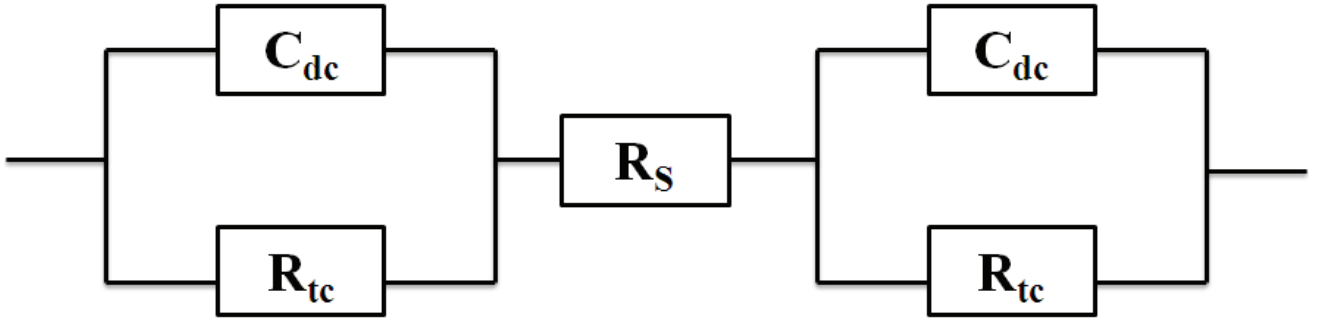


Fig.I.25: Modèle de circuit simplifié équivalent (sans impédance de Warburg) au transducteur conductimétrique à deux électrodes interdigitées utilisé dans ce travail

De plus, les travaux de Dzyadevych⁸⁹ sur les transducteurs interdigités et les biocapteurs conductimétriques ont permis de montrer que dans le domaine des hautes fréquences, la valeur de l'impédance n'est pas affectée par la résistance de transfert de charge \mathbf{R}_{tc} . Dans ce domaine de fréquences, l'impédance en phase est égale à la résistance de la solution.

L'intensité du signal en phase est égale à :

$$\mathbf{I} = \frac{\mathbf{U}_{excitation}}{\mathbf{Z}_{phase}} = \frac{\mathbf{U}_{excitation}}{\mathbf{R}_{sol}} = \mathbf{U}_{excitation} \times \mathbf{G} \quad (\text{Eq.I.20})$$

Or, dans notre système de mesure, les intensités sont directement converties en une tension (\mathbf{U}_{out}) au niveau de la détection synchrone (convertisseur courant/tension) aux bornes de la résistance de charge $\mathbf{R}_{circuit}$:

$$\mathbf{I} = \frac{\mathbf{U}_{out}}{\mathbf{R}_{circuit}} \quad (\text{Eq.I.21})$$

Nous avons donc :

$$\frac{\mathbf{U}_{out}}{\mathbf{R}_{circuit}} = \mathbf{U}_{excitation} \times \mathbf{G} \quad (\text{Eq.I.22})$$

Ce qui donne :

$$U_{out} = U_{excitation} \times G \times R_{circuit} \quad (\text{Eq.I.23})$$

A partir de cette relation, il est possible de déduire la formule pour déterminer G :

$$G = \frac{U_{out}}{U_{excitation} \times R_{circuit}} \quad (\text{Eq.I.24})$$

I.3 Les enzymes

Historiquement, les enzymes ont été les premières molécules de reconnaissance intégrées dans des biocapteurs et restent, de nos jours, l'élément biologique le plus utilisé et la base de la construction de nombreux biocapteurs pour des applications très variées du fait de leur pouvoir catalytique spécifique. Il s'agit également de l'élément de reconnaissance que nous avons utilisé pour l'élaboration de nos biocapteurs. Ce paragraphe est donc dédié à la description des principales caractéristiques des enzymes et à leur application au domaine des capteurs.

I.3.1 Définition d'une enzyme

Ainsi que l'IUPAC le définit dans son glossaire de termes utilisés en chimie médicinale¹¹⁰, une enzyme est une macromolécule qui fonctionne comme un biocatalyseur en augmentant la vitesse de certaines réactions biochimiques. La réaction biocatalysée part d'un ou plusieurs réactifs, appelé(s) substrat(s) de l'enzyme, et le(s) transforme(nt) en produit(s) (Eq.I.25).



I.3.2 Histoire de l'enzymologie

Cette histoire commence en 1815 lorsque Louis Joseph Gay-Lussac décrit pour la première fois la fermentation alcoolique. Cependant, ce n'est qu'en 1833 qu'Anselme Payen et Jean-François Persoz extraient pour la première fois une enzyme, l' α -amylase, à partir de malt. Un an plus tard, Theodor Schwann décrit la pepsine et l'isole en 1836 au cours de ces travaux sur les processus digestifs. En 1838, le Baron Charles Cagniard de La Tour démontre que la fermentation est due à des

organismes vivants, ce qui sera confirmé et étudié de manière plus approfondie par Louis Pasteur dans les années 1850 – 1870. En 1878, Friedrich Wilhelm Kühn propose d'appeler cette matière biologique « enzyme », du grec en (dans) et zyme (levain). Mais ce n'est que 20 ans plus tard qu'Emil Fischer démontre que les enzymes glycolytiques peuvent distinguer des stéréoisomères de sucres et propose un mécanisme de type clef-serrure (Fig.I.26) pour expliquer cette spécificité. L'enzyme agit comme une serrure dont la clé est son substrat, du fait de leurs formes géométriques complémentaires.

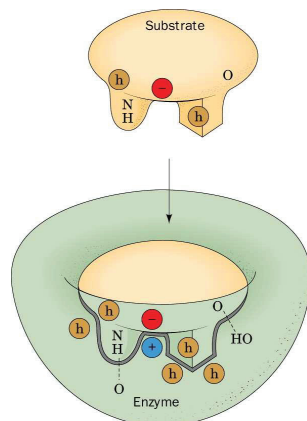


Fig.I.26 : Le modèle clef-serrure du complexe enzyme – substrat

Victor Henri a formulé la première théorie quantitative de la cinétique enzymatique en 1902 mais il faut attendre jusqu'en 1913 pour qu'elle soit complétée par Léonor Michealis et Maud Menten, aboutissant entre autre à l'établissement de l'équation que l'on connaît actuellement sous le nom de Michealis-Menten. La nature protéinique des enzymes a pu être confirmée avec les travaux de James Summer sur la cristallisation de l'uréase en 1926 et de John Northrop et Moses Kunitz dans les années 1930. Linus Pauling fut ensuite parmi les premiers à montrer que les enzymes agissent en stabilisant les états de transition au cours des réactions, un comportement à la base de leur mécanisme d'action. La structure de certaines enzymes a pu être élucidée grâce à l'évolution des techniques de caractérisation. Ainsi, la première séquence complète d'une enzyme, la ribonucléase de bœuf, a été établie en 1963, suivie par la première structure tridimensionnelle du lysozyme en 1965. Cette structure à haute résolution a marqué le début du champ de la biologie structurale et la compréhension des mécanismes d'action des enzymes à l'échelle atomique.

I.3.3 Nomenclature et classification des enzymes

On connaît actuellement environ 10000 enzymes qui se répartissent en plusieurs groupes selon leur mécanisme de catalyse. Chaque enzyme possède un numéro EC, défini par une commission internationale, associé à un nom recommandé lié au fonctionnement de cette enzyme. Chaque code d'enzyme comprend les lettres majuscules « EC » suivies de quatre nombres séparés par des points. Ces nombres représentent chacun une étape dans la précision de la classification de l'enzyme (Tab. I.2):

- le premier correspond à la réaction catalysée par l'enzyme, ce qui définit sa classe,
- le second répond aux informations du substrat généralement impliqué lors de la réaction, notamment des groupements chimiques sur lequel l'enzyme va réagir, par exemple les groupes EC 1.1 ou EC 1.3 composent des oxydoréductases qui réagissent respectivement sur le groupement CH-OH et CH-CH de substrat,
- le troisième concerne le substrat spécifique impliqué, les groupements accepteurs, comme l'oxygène (O₂) comme accepteur pour les oxydoréductases ou le groupement méthyle (CH₃-) à transférer pour les transférases,
- le quatrième caractérise la nature du substrat.

En ce qui concerne le nom de l'enzyme, en règle générale, il suffit d'ajouter le suffixe « ase » au nom de son substrat (par exemple, l'uréase est l'enzyme qui catalyse la réaction d'oxydation de l'urée) ou le type de réaction (par exemple, l'ADN polymérase intervient dans la formation de l'ADN). A titre exemple, l'enzyme glucose oxydase qui catalyse l'oxydation du glucose (C₆H₁₂O₆) en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et en D-glucono-δ-lactone (C₆H₁₀O₆) possède le numéro EC 1.1.3.4, ce qui veut dire que :

- l'enzyme appartient au groupe des oxydoréductases (EC 1),
- il s'agit d'une oxydoréductase qui agit sur les groupements donneurs CH-OH (EC 1.1),
- l'enzyme est une oxydoréductase qui agit sur les groupements donneurs CH-OH avec l'oxygène (O₂) comme accepteur (EC 1.1.3),
- le substrat de l'enzyme est le glucose (EC 1.1.3.4).

	Classe d'enzyme	Réaction correspondante	%
EC 1	Oxydoréductases (déshydrogénases, oxydases, peroxydases, oxygénases, réductases ...)	Réaction d'oxydoréduction comportant l'échange de protons entre donneurs et accepteurs	25 %
EC 2	Transférases	Réaction impliquant des transferts de groupements fonctionnels	30 %
EC 3	Hydrolases	Réaction d'hydrolyse provoquant la coupure de liaisons esters, osidiques ou peptidiques.	24 %
EC 4	Lyases	Réaction impliquant la fixation ou le départ d'un groupement chimique avec création d'une double liaison sur le substrat	13 %
EC 5	Isomérases	Réaction provoquant une modification interne de la molécule, telle que la racémisation, l'épimérisation ou la conversion cis-trans	3 %
EC 6	Ligases ou synthétases	Réaction avec la formation de liaisons C- O, C-S, C-N ou C-C. Ce type de réaction ne peut se produire que si elle est couplée avec l'hydrolyse d'un nucléoside- triphosphate.	5 %

Tableau I.2 : Nomenclature et pourcentage des principaux groupes d'enzymes répertoriés.

I.3.4 Structures et mécanismes

I.3.4.1 Structure générale¹¹¹

Les enzymes sont des protéines souvent globulaires contenant entre 62 résidus d'acides aminés (cas du monomère de 4-oxalocrotonate tautomérase¹¹²) à plus de 2500 résidus (cas de la synthase des acides gras animaux¹¹³). Les enzymes se trouvent dans les êtres vivants et leurs séquences d'acides aminés sont généralement codées par les molécules d'ADN. Il existe néanmoins un petit nombre d'enzymes codées par l'ARN.

On peut distinguer, comme pour toutes les protéines, quatre niveaux d'organisation dans la structure des enzymes:

- La structure primaire correspond à la séquence d'acides aminés qui les compose. Ceux-ci sont au nombre de 22 (Tableau I.3). Cette structure permet de connaître la composition chimique de l'enzyme (nature et pourcentages des différents acides aminés) ainsi que l'ordre

d'enchaînement de ces unités. Elle ne donne aucune information sur l'organisation spatiale de la biomolécule,

- La structure secondaire présente le 1^{er} degré d'organisation spatiale (conformation) de la chaîne polypeptidique. Si la conformation de chaque protéine est unique, on retrouve souvent deux motifs réguliers de repliement dans certaines parties des protéines : le premier motif, l'hélice α , est stabilisé par des liaisons hydrogènes intracaténares, et le second motif, appelé feuillet β , est stabilisé par des liaisons hydrogènes formées entre deux chaînes polypeptidiques,
- La structure tertiaire présente l'organisation complète tridimensionnelle de la chaîne polypeptidique, permettant le rapprochement d'acides aminés éloignés dans la structure secondaire, à l'origine de la formation du ou des sites actifs de l'enzyme (Fig.I.27),
- Si l'enzyme est formée d'un complexe constitué de plusieurs chaînes polypeptidiques (appelées monomères), la structure globale est désignée par le terme de structure quaternaire.

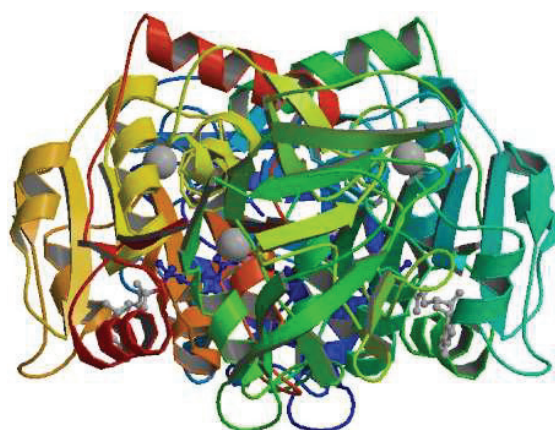


Fig.I.27 : Structure tertiaire de l'alcool déshydrogénase extraite du foie de cheval

Chapitre I : Etude bibliographique

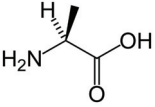
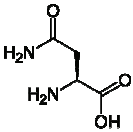
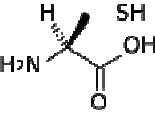
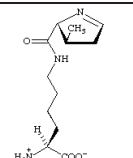
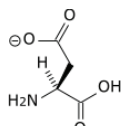
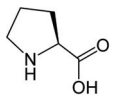
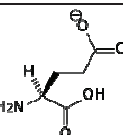
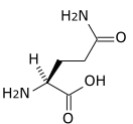
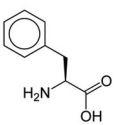
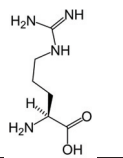
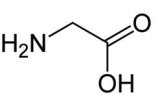
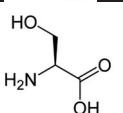
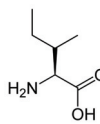
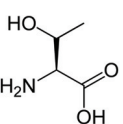
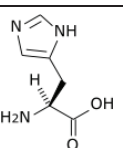
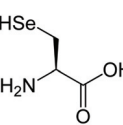
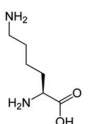
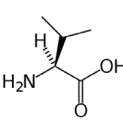
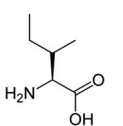
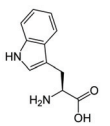
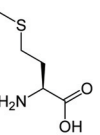
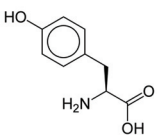
Acide aminé	Abréviation	Code	Structure	Acide aminé	Abréviation	Code	Structure
Alanine	Ala	A		Asparagine	Asn	N	
Cystéine	Cys	C		Pyrrolysine	Pyl	O	
Acide aspartique	Asp	D		Proline	Pro	P	
Acide glutamique	Glu	E		Glutamine	Gln	Q	
Phénylalanine	Phe	F		Arginine	Arg	R	
Glycine	Gly	G		Sérine	Ser	S	
Histidine	His	H		Thréonine	Thr	T	
Isoleucine	Ile	I		Sélénocystéine	Sec	U	
Lysine	Lys	K		Valine	Val	V	
Leucine	Leu	L		Tryptophane	Trp	W	
Méthionine	Met	M		Tyrosine	Tyr	Y	

Tableau I.3: Liste des acides aminés, leurs abréviations et leurs formules

L'activité catalytique des enzymes est déterminée par leur structure tridimensionnelle. La plupart des enzymes sont de dimension bien plus grande que celle des substrats avec lesquels elles interagissent (Fig.1.28). Toutefois, une petite portion de l'enzyme seulement (quelques acides aminés), plus connue sous le nom de site actif, est directement impliquée dans la catalyse. Cette région fixe le substrat et effectue ensuite la réaction de transformation. Les sites sont constitués d'acides aminés mais également de composants chimiques tels que des ions métalliques (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+}) ou des molécules organiques appelées cofacteurs (biotine, vitamines B) qui sont essentiels à l'activité catalytique.

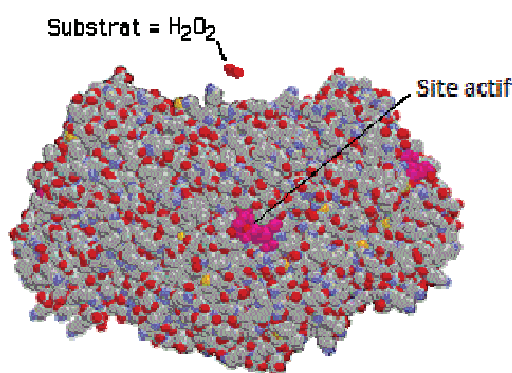


Fig.1.28: Comparaison entre la taille du substrat, du site actif et de l'enzyme

I.3.4.2 Site actif

Les sites actifs sont des cavités tridimensionnelles de caractère non polaire dans lesquelles s'insèrent les substrats. L'eau est normalement exclue du site actif lorsque le substrat est lié, sauf si elle constitue elle-même un réactif.

Le site actif comporte au moins deux parties fonctionnelles, qui peuvent ou non être voisines sur la chaîne polypeptidique :

- le site de reconnaissance du substrat est constitué d'acides aminés à l'origine de l'orientation du substrat, et donc de la spécificité de l'enzyme,
- le site catalytique est constitué des résidus qui sont directement impliqués dans la formation et la rupture des liaisons chimiques. Ces résidus sont souvent localisés au fond de la cavité, et dans la majorité des cas, possèdent des chaînes latérales ioniques ou réactives (ex. histidine, lysine, cystéine, sérine, acide aspartique ou acide glutamique).

Les substrats se lient aux enzymes par l'intermédiaire d'interactions faibles, les constantes d'association correspondantes allant de 10^{-2} à 10^{-8} mol.L⁻¹ et les enthalpies libres d'interaction étant situées entre -3 et -12 kcal/mol. Les interactions sont généralement de type Van der Waals,

électrostatiques ou impliquent la formation de liaisons hydrogènes. Ces 3 types de liaisons non-covalentes diffèrent dans leurs contraintes géométriques, leur force et leur spécificité. Elles sont par ailleurs toutes affectées, mais de manière différente, par la présence d'eau.

Interactions électrostatiques

De manière générale, la force d'une interaction électrostatique entre deux corps chargés est donnée par la loi de Coulomb:

$$F = \frac{|q_1 q_2|}{r^2} k_e \quad (\text{Eq.I.26})$$

avec r : distance de séparation entre les deux charges ; k_e : constant de Coulomb ; q_1 et q_2 : charges des deux corps (positives ou négatives)

Un substrat chargé négativement peut former une liaison électrostatique avec la chaîne latérale des résidus de lysine, d'arginine et d'histidine, ainsi qu'avec le groupement amine terminal d'une chaîne polypeptidique si ce groupement est chargé positivement à la valeur du pH du milieu. Dans le cas où le substrat est chargé positivement, il peut interagir avec les résidus d'acide aspartique et d'acide glutamique, ainsi qu'avec un groupement carboxylate terminal.

Liaisons hydrogènes

En milieu biologique, des liaisons hydrogènes peuvent se créer entre les atomes d'hydrogène des fonctions -OH ou -NH et des atomes d'oxygène ou d'azote. Les distances peuvent aller de 2,6 à 3,10 Å et les énergies de liaison de 3 à 7 kcal/mol. 11 des 20 acides aminés peuvent former des liaisons hydrogènes par l'intermédiaire de leurs chaînes latérales. Une caractéristique importante d'une liaison hydrogène est son aspect directionnel, ainsi que la forme du site actif qui exclut les molécules n'ayant pas une forme complémentaire ce qui confère la spécificité aux interactions enzyme-substrat.

Interactions de Van der Waals

L'interaction de Van der Waals est due à une force attractive non-spécifique entre deux atomes qui sont séparés par 3 à 4 Å. L'énergie de liaison pour une paire d'atomes est de l'ordre de 1 kcal/mol (interaction faible). Une interaction efficace de type Van der Waals entre un substrat et une enzyme ne peut avoir lieu que si leurs formes sont complémentaires du point de vue stérique.

I.3.4.3 Mécanismes d'interaction

Une enzyme est un catalyseur biologique dont la fonction principale est d'augmenter la vitesse de la réaction qu'il catalyse (modification du bilan cinétique) sans en modifier le bilan thermodynamique.

Elle peut le faire de différentes manières, à savoir :

- en abaissant l'énergie d'activation de la réaction en créant un environnement dans lequel l'état de transition est stabilisé (Fig.I.29),
- en abaissant l'énergie de l'état de transition sans déformer le substrat, en créant un environnement dont la distribution de charge est opposée à celle de l'état de transition,
- en fournissant une voie alternative. Par exemple, elle peut interagir temporairement avec le substrat pour former un complexe enzyme-substrat intermédiaire, ce qui serait impossible en absence de l'enzyme,
- en réduisant le changement d'entropie de la réaction, amenant l'ensemble des substrats dans une orientation permettant à la réaction d'avoir lieu.

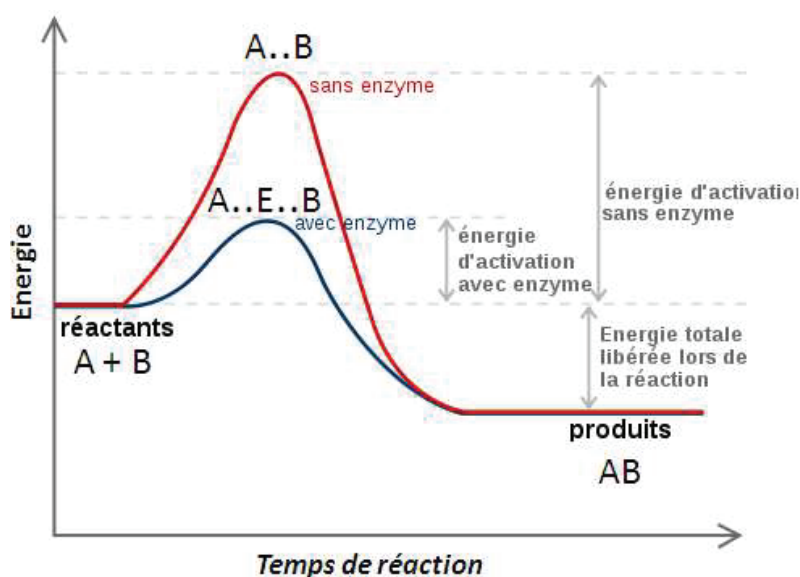


Fig.I.29 : Comparaison du niveau d'énergie requis pour 2 réactions dont l'une est catalysée par une enzyme et l'autre pas

Le tableau I.4 présente quelques facteurs d'accroissement de vitesses réactionnelles en présence de catalyse enzymatique.

Enzyme	Réaction	Facteur d'accroissement de la vitesse
Chymotrypsine	Hydrolyse des liaisons amides au niveau de la liaison carboxylique de la tyrosine, du tryptophane, de la phénylalanine ou de la leucine	10^7
Lysozyme	Hydrolyse des peptidoglycanes constituant la paroi bactérienne	2.10^8
Uréase	Hydrolyse de l'urée : $(\text{NH}_2)_2\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{NH}_3$	10^{14}
Phosphatase alcaline	Hydrolyse des esters mono-phosphates pour donner un ion phosphate et un alcool	10^{17}

Tableau I.4 : Quelques exemples de facteur d'accroissement de vitesse réactionnelle en présence d'enzymes

I.3.4.4 Spécificité

La complémentarité dans la structure, les charges, les propriétés hydrophile/hydrophobe de l'enzyme, spécialement son site actif et de son substrat sont à l'origine de la grande sélectivité de la réaction enzymatique. Il est possible dans certains cas d'atteindre des niveaux de sélectivité assez impressionnants, notamment pour les enzymes impliquées dans la reproduction et l'expression du génome. Il en va ainsi de l'enzyme ADN polymérase qui intervient non seulement dans la réplication de l'ADN au cours du cycle cellulaire, mais aussi dans des processus de réparation et de recombinaison de l'ADN. Cette enzyme catalyse d'abord les réactions, puis vérifie que les produits sont bien formés dans une deuxième étape. Ce processus à deux étapes conduit à un taux d'erreur moyen de moins de un sur 100 millions, témoignant la haute spécificité des polymérases de mammifères. On retrouve ce niveau de précision pour d'autres enzymes telles que l'ARN polymérase, les aminoacyl-ARNt synthétases et les ribozymes.

Bien que le modèle « clef-serrure » de Fischer puisse rendre compte de la spécificité de l'enzyme, il ne parvient pas à justifier le fait que certaines enzymes soient capables de catalyser une réaction avec toute une gamme de substrats différents. Daniel Koshland explique ce phénomène par le fait que les enzymes sont des structures assez souples, le site actif est donc constamment remodelé lorsque le substrat interagit avec l'enzyme. Dans ce cas, le site actif de l'enzyme n'est plus exactement complémentaire à son substrat dans son état fondamental mais dans son état actif. En conséquence, les substrats ne se contentent pas de se lier à un site actif rigide. Ils modifient légèrement la conformation de l'enzyme. Ce phénomène est appelé «ajustement induit de Koshland » (Fig.I.30).

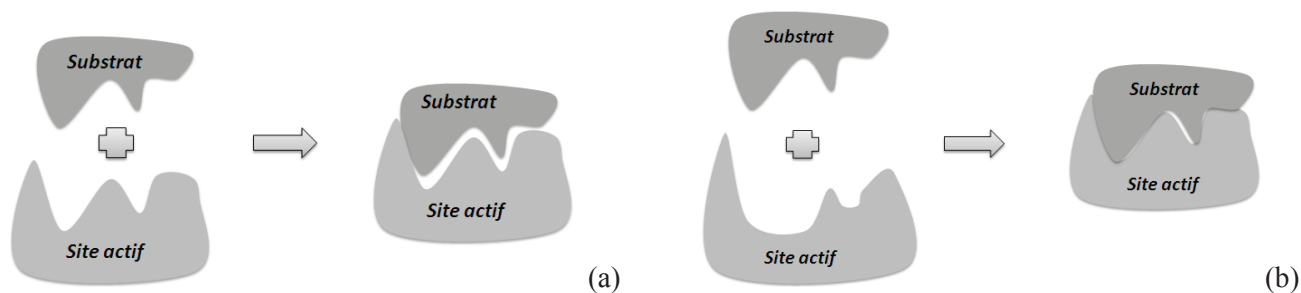


Fig.I.30 : Deux modes de fonctionnement du site actif – (a) : mode complémentaire : clé – serrure et (b) : mode induit

I.3.4.5 Cofacteurs

L'activité catalytique des enzymes, hormis celle des hydrolases, nécessite la participation d'une autre partie non protéique et thermostable, appelée cofacteur. Le cofacteur peut être inorganique, par exemple un ion métallique ou un cluster fer-soufre, ou organique, généralement dérivé d'une vitamine (ex : flavine, hème).

Les cofacteurs organiques, que l'on appelle coenzymes, peuvent être des groupements prosthétiques qui sont fortement liés à l'enzyme, qui participent à la réaction et sont régénérés à la fin de celle-ci. Les co-enzymes peuvent être également liés de manière transitoire à l'enzyme. Ils sont dans ce cas appelés co-enzymes libres et agissent comme des substrats particuliers, ou co-substrats. Les coenzymes peuvent jouer le rôle d'activateurs ou de transporteurs.

Groupements prosthétiques – Coenzymes activateurs

Les groupements prosthétiques sont fixés à l'apoenzyme par des liaisons fortes (liaisons covalentes) et/ou des liaisons faibles (liaisons ioniques et hydrogènes). Ils sont spécifiques d'une seule enzyme et ne s'en détachent pas au cours de la réaction. Leur séparation de l'enzyme peut entraîner sa dénaturation.

L'exemple le plus connu est le coenzyme flavine adénine dinucléotide (FAD) (Fig.I.31) dont le mécanisme est présenté ci dessous:



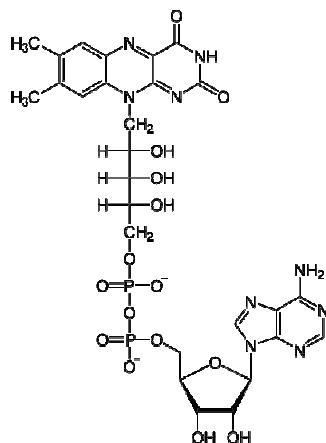


Fig.I.31: Structure chimique du coenzyme flavine adénine dinucléotide (FAD)

CoE libre – Coenzyme transporteur

Contrairement aux groupements prosthétiques, ces coenzymes se lient à l'enzyme de manière transitoire par l'intermédiaire de liaisons faibles et sont donc facilement dissociables de l'enzyme. Ils sont souvent modifiés après la réaction et doivent être ensuite régénérés par une 2ème enzyme. Plusieurs enzymes peuvent utiliser le même coenzyme. Par exemple, environ 700 enzymes sont connues pour utiliser le coenzyme nicotinamide adénine dinucléotide NAD^+ (Fig.I.32).

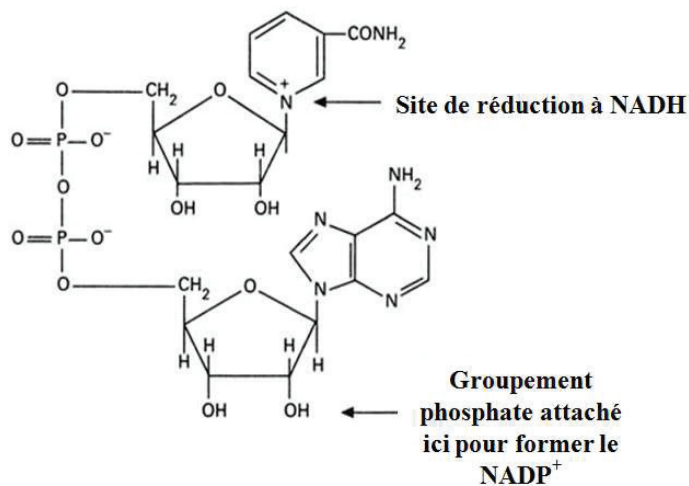


Fig.I.32: Structure chimique du coenzyme NAD^+

Le principe de fonctionnement de ce coenzyme est plus complexe que celui de la FAD puisqu'il met en œuvre un plus grand nombre d'étapes :

- Fixation de NAD^+ à l'apoenzyme



- Fixation du substrat pour la formation complexe ternaire



- Echange d'électrons et de protons



- Libération du produit



- Dissociation de l'enzyme



- Régénération du coenzyme



I.3.5 Cinétique enzymatique

Par définition, l'activité d'une enzyme est la quantité nécessaire pour convertir une quantité donnée de substrat en produit, en un temps donné, et dans des conditions de température et de pH spécifiées (ex. pH 7.0 et 25°C), le substrat étant en excès par rapport à l'enzyme. Même si dans le système S.I., l'unité d'activité est le katal (symbole : kat) correspondant à la quantité d'enzyme conduisant à la consommation de 1 mol de substrat par second, l'unité la plus souvent utilisée (U) se définit par rapport à la transformation de 1 μmol de substrat par minute (1 U= 16,6 nkat). L'activité spécifique d'une enzyme est l'activité catalytique par unité de masse (U/mg d'enzyme).

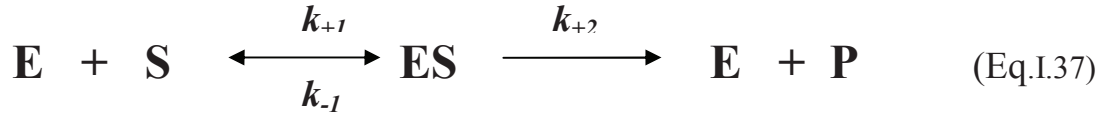
La cinétique des réactions enzymatiques obéit dans bien des cas au modèle proposé par Michaelis-Menten dont il est possible de déduire les valeurs de la constante de Michaelis K_M et de la vitesse maximale de réaction V_M .

La constante de Michaelis permet de savoir quel est le degré d'adaptation de l'activité de l'enzyme à la concentration habituelle de son substrat dans la cellule. Pour la plupart des enzymes, K_M est proche de la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat. Quand elle est élevée, cela signifie que la fixation du substrat sur l'enzyme est faible. Quand elle est basse, cela veut dire que l'affinité du substrat pour l'enzyme est forte. Pour les concentrations en substrats inférieures ou égales à K_M , la vitesse de la réaction dépend de la vitesse d'association entre l'enzyme et le substrat.

I.3.5.1 Modèle de Michaelis-Menten

Description

Dans le modèle de Michaelis-Menten, la réaction enzymatique peut être représentée sous la forme simplifiée suivante :



Avec E : enzyme ; S : substrat ; ES : complexe enzyme-substrat ; P : produit

La vitesse de formation du produit est :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_{+2}[ES] \quad (\text{Eq.I.38})$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_{+1}[E][S] - (k_{-1} + k_{+2})[ES] \quad (\text{Eq.I.39})$$

Si $[E]_0$ représente la concentration initiale en enzyme, on a :

$$[E]_0 = [E] + [ES] \quad (\text{Eq.I.40})$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_{+1}\{[E]_0 - [ES]\}[S] - (k_{-1} + k_{+2})[ES] \quad (\text{Eq.I.41})$$

D'autre part,

$$-\frac{d[S]}{dt} = k_{+1}[E][S] - k_{-1}[ES]$$

Avec les conditions initiales : $[S]_{t=0} = S_0$ et $[ES]_{t=0} = 0$, la résolution de ces équations permet de connaître l'évolution de la concentration des différentes espèces participant à la réaction.

On peut voir sur la figure I.33 que la concentration de ES se stabilise au bout d'un temps très court, ce qui permet de supposer l'établissement rapide d'un état quasi stationnaire.

Cette hypothèse est valable seulement si $[E_0] \ll [S_0]$.

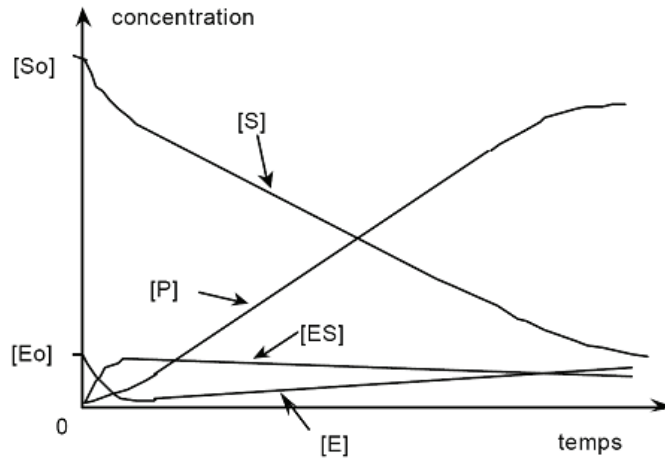


Fig.I.33: Evolution de la concentration des espèces régissantes pour $k_{+1} \sim k_{-1} \sim k_{+2}$

Avec l'approximation de l'état pré-stationnaire (délai pour que la concentration du complexe enzyme-substrat soit constante) proposé par deux chercheurs britanniques Briggs et Haldane en 1925, on a :

$$[ES] = \text{constante}, \text{ soit } \frac{d[ES]}{dt} = 0$$

On en déduit :

$$[ES] = \frac{k_{+1}[E]_0[S]}{k_{+1}[S] + k_{-1} + k_2} \quad (\text{Eq.I.42})$$

Si on suppose que :

$$V_M = k_{+2}[E]_0 \quad \text{et} \quad K_M = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$$

La vitesse de réaction est alors donnée par l'équation de Michaelis-Menten :

$$v = V_M \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Eq.I.43})$$

Deux cas limites peuvent être envisagés :

- Si $[S] \ll K_M$, l'expression devient

$$v = \frac{k_{+2}[E]_0}{K_M} [S] \quad (\text{Eq.I.44})$$

La cinétique de réaction est d'ordre 1 par rapport à S. Le rapport k_{+2}/K_M est fonction des autres constantes de vitesse :

$$\frac{k_{+2}}{K_M} = \frac{k_{+2}k_{+1}}{k_{-1} + k_{+2}} \quad (\text{Eq.I.45})$$

- Si $[S] \gg K_M$:

$$v = k_{+2}[E]_0 \quad (\text{Eq.I.46})$$

La cinétique de réaction est d'ordre 0 par rapport à S. On atteint la vitesse maximale V_M . La représentation graphique de l'équation I.43 permet de décrire le comportement cinétique de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat spécifique (Fig.1.34).

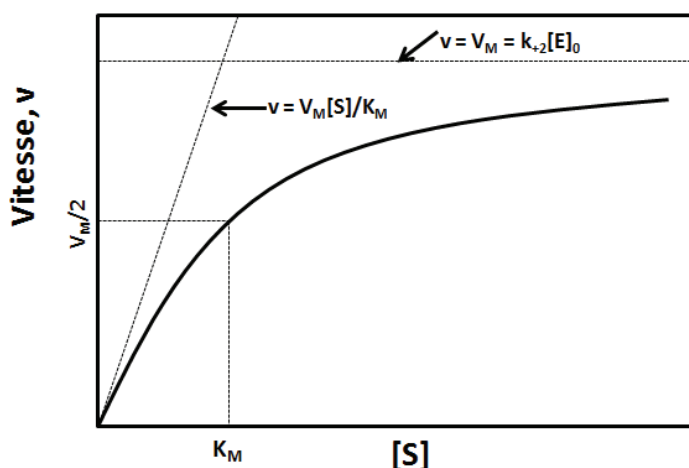


Fig.1.34 : Représentation graphique d'une cinétique enzymatique michaelienne.
Evolution de la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat.

Représentations linéaires de l'équation de Michaelis-Menten

La détermination graphique directe de V_M et K_M n'est pas toujours très précise, et d'autres méthodes ont été proposées. Elles reposent sur une linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten. En prenant l'inverse de la vitesse on obtient :

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K_M}{V_M} \times \frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_M} \quad (\text{Eq.I.48})$$

Cette écriture de l'équation de Michaelis-Menten est appelée représentation de Lineweaver-Burk.

La représentation graphique :

$$\frac{1}{\vartheta} = f\left(\frac{1}{[S]}\right) \text{ est une droite de pente } K_M/V_M \text{ (Fig.I.35)}$$

Une autre représentation a été proposée par Eadie-Hofstee. En écrivant l'équation I.49 sous la forme suivante :

$$\vartheta K_M + \vartheta[S] = V_M[S] \quad (\text{Eq.I.49})$$

On obtient :

$$\frac{\vartheta}{[S]} = \frac{V_M}{K_M} - \frac{\vartheta}{K_M} \quad (\text{Eq.I.50})$$

La représentation graphique :

$$\frac{\vartheta}{[S]} = f(\vartheta) \text{ est une droite de pente } -1/K_M \text{ (Fig.I.35)}$$

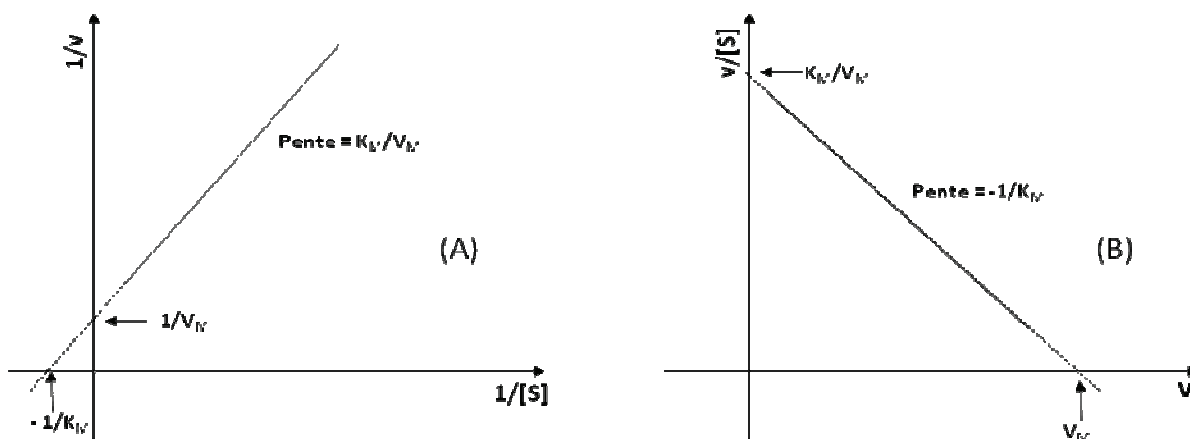


Fig.I.35 : Représentation graphique de la linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten,
A : représentation de Lineweaver-Burk et B : représentation d'Eadie-Hofstee

Signification pratique des constantes cinétiques

- La constante catalytique k_{+2} ($k_{+2} = V_M/[E]_0$) est une constante de vitesse du premier ordre. Elle représente la fréquence à laquelle l'enzyme accomplit l'acte catalytique (en anglais "turnover") lorsque l'enzyme est saturée en substrat. Elle mesure donc **l'efficacité catalytique**.
- Constante de Michaelis, constante de dissociation : la constante de Michaelis K_M est égale à k_{-1}/k_1 dans le cas où $k_{-1} \gg k_2$, c'est-à-dire que le complexe ES se dissocie en relarguant le

substrat libre à une vitesse nettement plus grande qu'il ne subit l'acte catalytique. Dans ce cas, K_M est égale à la valeur de la constante de dissociation du complexe ES, elle traduit l'affinité du substrat pour l'enzyme. Les expressions de la vitesse pour le modèle de Michaelis-Menten et de Briggs-Haldane sont identiques. Nous remarquons que dans le modèle de Michaelis-Menten l'hypothèse d'équilibre rapide entre les formes libres de l'enzyme, du substrat et du complexe est plus restrictive, elle est un cas particulier du modèle de Briggs-Haldane. L'affinité du substrat pour l'enzyme est d'autant plus grande que la valeur de la constante de Michaelis est petite.

Lorsque la valeur de $[S]_0$ est égale à la valeur de K_M , la valeur de la vitesse initiale est égale à $V_M/2$, ceci quel que soit le modèle.

- **Constante de spécificité** : une enzyme peut avoir une très grande affinité pour un substrat mais une constante catalytique faible et inversement. Afin de caractériser la spécificité globale d'une enzyme vis-à-vis d'un substrat, on utilise le rapport suivant, appelé constante de spécificité :

$$r_{sp} = \frac{k_{+2}}{K_M} \quad (\text{Eq.I.51})$$

La limite supérieure de r_{sp} est la constante de vitesse d'association de l'enzyme E et du substrat S : k_1 . Cette constante a pour limite la vitesse de diffusion des macromolécules dans le milieu réactionnel qui est de l'ordre de $10^8 - 10^9 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$

Le tableau I.5 présente les valeurs de ces trois constantes pour quelques enzymes.

<i>Enzyme</i>	<i>Substrat</i>	$k_{+2} (\text{s}^{-1})$	$K_M (\text{M})$	$r_{sp} (\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1})$
Acétylcholine estérase	Acétylcholine	$1,4 \cdot 10^4$	$9 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^8$
Catalase	Peroxyde d'hydrogène	$4,6 \cdot 10^3$	$28,6 \cdot 10^{-3}$	$1,6 \cdot 10^5$
Pénicillinase	Benzylpénicilline	$2 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^7$
Uréase	Urée	$5,8 \cdot 10^3$	$2,9 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^6$
Glucose oxidase	Glucose	$1,9 \cdot 10^3$	$50,3 \cdot 10^{-3}$	$3,8 \cdot 10^4$

Tableau I.5 : Valeurs des constantes catalytiques de Michaelis et de spécificité de quelques enzymes (site brenda.com)

1.3.5.2 Effet coopératif – Equation de Hill

Certaines enzymes ne présentent pas un comportement cinétique de type michaelien. Dans ce cas, la courbe vitesse initiale vs concentration en substrat est généralement une sigmoïde, indiquant une fixation coopérative du substrat sur le site actif. Ceci veut dire que la fixation d'une molécule de

substrat affecte la fixation de la suivante. Elle peut la renforcer ou au contraire la gêner. On parle alors de coopérativité positive ou négative. Ce comportement est souvent observé dans le cas d'enzymes multimériques possédant plusieurs sites d'interaction.

L'équation de Hill est souvent utilisée pour rendre compte du phénomène de coopérativité (Eq.I.52) :

$$V = \frac{V_{max}[S]^n}{(k_H^n + [S]^n)} \quad (\text{Eq.I.52})$$

Avec V_{max} : vitesse maximale de réaction; $[S]$: concentration de substrat; k_H : constante de Hill; n : coefficient de Hill, représentant de degré de la coopérativité de la fixation.

- Si $n = 1$: les fixations successives de substrat sont indépendantes. Il s'agit d'une fixation simple et l'équation de Hill est semblable à celle de Michaelis-Menten
- Si $n > 1$: il y a coopérativité positive
- Si $n < 1$: il y a coopérativité négative.

1.3.5.3 Facteurs influençant l'activité d'une enzyme libre

Influence de la température

La vitesse des réactions chimiques augmente généralement avec la température en raison de l'énergie cinétique fournie aux molécules qui augmente le nombre de collisions efficaces conduisant aux produits de réaction. Cependant, dans le cas d'une réaction enzymatique d'autres paramètres vont avoir une influence. Ainsi, la stabilité du complexe enzyme-substrat ou l'ionisation de certains sites varient avec la température. Par ailleurs, la structure tertiaire des enzymes, très ordonnée et complexe, est nécessaire à la fixation stéréospécifique du substrat. Une élévation de la température peut détruire cette structure conduisant à une diminution, voire à la perte de l'activité enzymatique (désactivation thermique irréversible).

Ainsi que le montre la figure 1.36, il existe une température optimale qui permet d'obtenir une vitesse constante pendant toute la durée de l'expérience. Au-delà de la température critique T_c , il se produit le phénomène de dénaturation. Les enzymes de faible masse moléculaire portant une seule chaîne polypeptidique et des liaisons disulfures sont plus sensibles à la dénaturation que les enzymes à grande masse moléculaire. La dénaturation est souvent très sensible dès 50°C à 60°C. En général, il est conseillé de travailler au moins à 10°C en dessous du seuil de dénaturation. La résistance de l'enzyme vis-à-vis de la dénaturation thermique dépend également d'autres paramètres tels que le pH, la force ionique ou la présence de ligands.

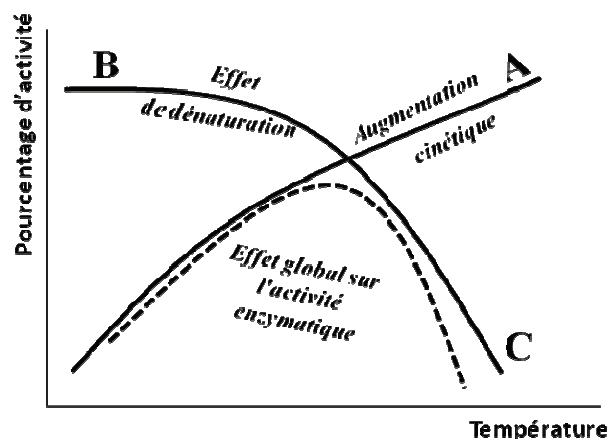


Fig.I.36: Effet de la température sur la vitesse d'une réaction chimique (A), sur la dénaturation d'une enzyme (B) et sur l'activité globale d'une enzyme(C)¹¹⁴

Influence du pH

L'effet du pH sur l'activité enzymatique est souvent lié à l'état d'ionisation du substrat (dont une forme seulement est catalysée) ou d'un certain nombre de groupements dissociables de l'enzyme nécessaires pour maintenir la conformation du site actif et qui participent à l'élaboration du complexe ES. Le pH peut donc avoir une influence sur les constantes telles que k_{+2} , K_M et k_{+2}/K_M (Fig.I.37).

Les différents groupements dissociables pouvant être présents au niveau du site actif sont les groupements carboxyles ou amines situés en bout de chaîne, les groupements imidazoles des résidus histidines, guanidines des arginines, sulfhydryles des cystéines et phénoliques des tyrosines. La valeur des pKa de ces groupements dépend beaucoup de leur environnement polaire ou non polaire. Dans la pratique, le pH optimal est choisi aussi en fonction des conditions de mesure donc un compromis est nécessaire surtout lorsqu'une séquence de réactions enzymatiques est mise en jeu.

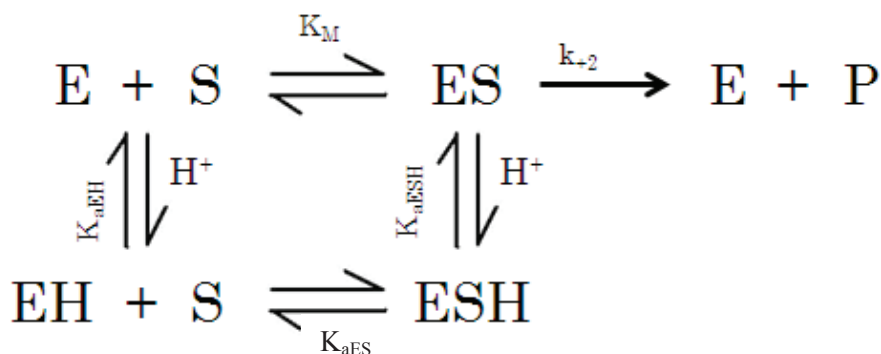


Fig.I.37: Effet du pH sur les équilibres mis en jeu dans la réaction enzymatique¹¹⁴

Ces effets de pH et leur amplitude diffèrent d'une enzyme à l'autre (Fig.I.38). La plupart des enzymes sont actives dans un domaine limité de pH. On peut attribuer ce fait à la stabilité de la

protéine enzymatique dans cette zone de pH. Le pH optimal est fonction du site actif et de l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

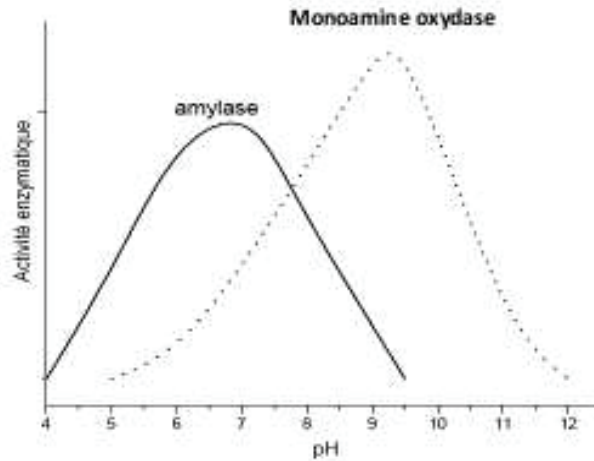


Fig.I.38: Comparaison de l'effet du pH sur l'amylase et la monoamine oxydase

Influence de la concentration en substrat

La figure I.39 représente l'évolution de la vitesse enzymatique avec la concentration en substrat pour une enzyme présentant un comportement michaelien. Pour une quantité fixe d'enzyme et à faible concentration de substrat, la vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration en substrat. A des concentrations de substrat élevées, la vitesse de réaction est indépendante de la concentration en substrat et tend vers une valeur constante (vitesse maximale V_M). Pour effectuer des mesures d'activité catalytique, il sera donc important de se placer en excès de substrat afin de pouvoir directement mesurer V_M .

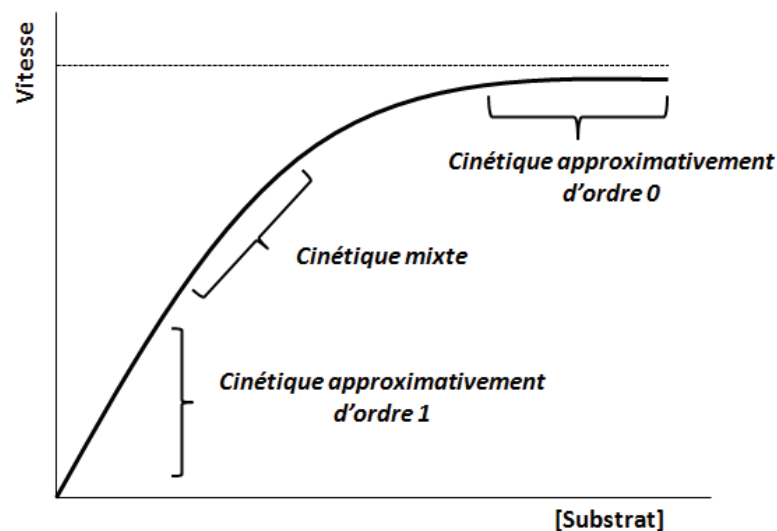


Fig.I.39: Effet de la concentration en substrat sur la vitesse de réaction pour une enzyme de comportement michaelien

Influence de la composition du milieu réactionnel

Ainsi que nous l'avons vu précédemment, le pH affecte de manière significative les réactions enzymatiques. Celles-ci sont donc généralement réalisées en milieu tamponné. Dans ce cas, la nature du tampon ainsi que sa concentration doivent être choisies avec soin. En effet, une même enzyme peut avoir une activité plus grande en milieu tampon citrate qu'en milieu tampon acétate au même pH, la différence provenant du fait que le citrate chélate les ions métalliques présents pouvant inhiber l'enzyme. La présence des sels peut aussi affecter la vitesse d'une réaction enzymatique, soit par déplacement de l'équilibre de formation du complexe activé, soit par leur combinaison avec les réactifs. Pour obtenir des résultats reproductibles, la force ionique du système ne doit pas varier de façon trop importante.

I.3.6 Quelques exemples d'enzymes

Comme nous l'avons déjà mentionné, il existe différentes classes d'enzymes selon le type de réactions qu'elles catalysent. Les paragraphes suivants décrivent les caractéristiques principales des enzymes que nous avons utilisées dans ce travail et qui appartiennent toutes à la catégorie des oxydoréductases.

I.3.6.1 Formaldéhyde déshydrogénase

La formaldéhyde déshydrogénase (FDH) (EC 1.2.1.1)^{115, 116}, comme son numéro EC l'indique, est une oxydoréductase agissant sur les groupements donneurs aldéhydes en utilisant NAD^+ ou NADP^+ comme accepteur. Son substrat principal est le formaldéhyde. La réaction d'oxydation du formaldéhyde catalysée par le FDH est la suivante :



Cette enzyme est présente dans une grande variété de micro-organismes^{115, 116} et participe à l'élimination du formaldéhyde provenant de sources environnementales ou endogènes. Lorsqu'elle provient d'une souche de micro-organisme telle que la souche bactérienne *Pseudomonas putida* (PFDH, EC 1.2.1.46)^{115, 117}, le cofacteur NAD^+ suffit au bon déroulement de la réaction. Par contre, il a été montré que certaines FDHs nécessitent la participation de NAD^+ et de glutathion pour pouvoir assurer leur activité catalytique. C'est le cas par exemple de la FDH issue du champignon *Candida boidinii*^{115, 116, 118}.

L'enzyme pFDH, dans sa forme active, est un homotétramère composé par quatre sous-unités identiques, dont chacune comprend 398 résidus d'acides aminés et deux ions zinc (un ion Zn^{2+} pour la structure et un autre ion pour l'activité catalytique). La masse moléculaire de chaque sous unité de pFDH est d'environ 42 kDa. La sous-unité de la pFDH (Fig.I.40) contenant le site actif vis-à-vis du formaldéhyde est constituée de deux domaines séparés par une fente contenant une poche profonde qui permet de recevoir la partie nicotinamide du cofacteur NAD. L'un des domaines de cette sous unité est responsable de la fixation de cofacteur tandis que l'autre partie contient les groupements permettant la fixation du substrat. Cette dernière est donc à l'origine de la spécificité de l'enzyme. Les tailles de ces deux domaines ne sont pas égales. Le domaine catalytique comprend 231 acides aminés, tandis que le domaine de fixation du cofacteur ne comporte que 167 acides aminés.

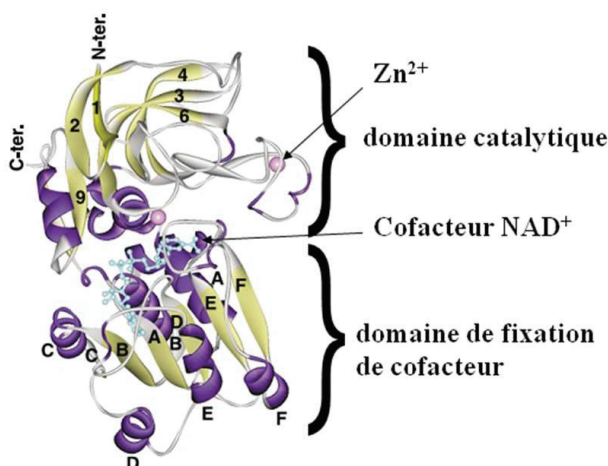


Fig.I.40: Structure de la sous- unité constituant l'enzyme pFDH

L'ion Zn^{2+} participant aux activités catalytiques de l'enzyme est en coordinence tétraédrique avec trois acides aminés (cystéine, histidine, acide aspartique) et une molécule d'eau qui va être remplacée par la molécule du substrat ou de l'inhibiteur. L'ion Zn^{2+} intervient dans le mécanisme catalytique comme un acide de Lewis dont la fonction est de renforcer la polarité de la liaison du substrat et de la rendre plus facilement hydrolysable¹¹¹, notamment quand les aldéhydes aliphatiques se présentent sous forme hydraté dans la solution (formes gem-diol). Le deuxième atome de Zn est quant à lui lié à quatre résidus cystéines.

Le mécanisme principal de conversion du formaldéhyde catalysé par la pFDH proposé dans la littérature est celui décrit par les réactions I.31 à I.36. Il comporte essentiellement l'étape d'oxydation d'une molécule d'aldéhyde de façon irréversible par le complexe $Enz-NAD^+$ pour former le complexe carboxylate correspondant suivie de l'étape de dissociation du produit, de l'enzyme et du coenzyme. Toutefois, Tanaka *et al.* ont montré que ce mécanisme comporte éventuellement une autre voie conduisant à la réduction du formaldéhyde en alcool¹¹⁵ (Fig.I.41).

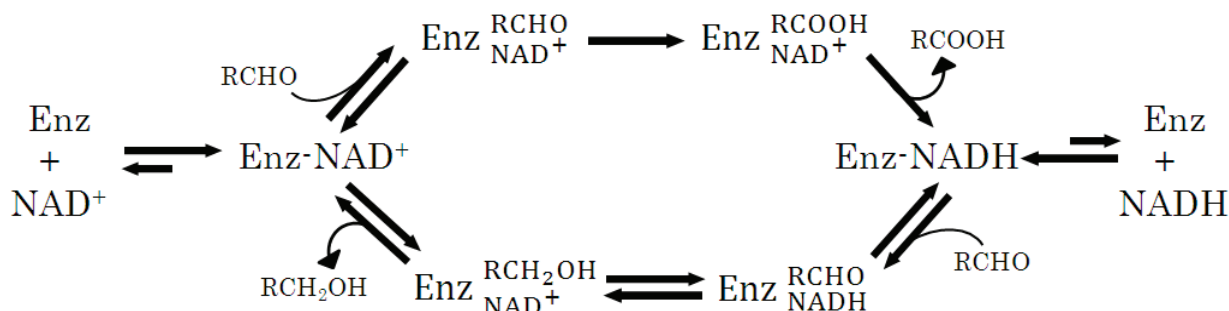


Fig.I.41: Schéma d'un mécanisme possible pour la réaction de dismutation des aldéhydes catalysée par la pFDH¹¹⁵

Cette voie consiste en la fixation d'une autre molécule d'aldéhyde au complexe Enz-NADH suivie par sa réduction en Enz-NAD-alcool. Cette voie est possible à pH neutre où la liaison de l'aldéhyde au complexe Enz-NADH et sa réduction sont plus rapides que la dissociation du complexe Enz-NADH, NADH étant fermement (mais pas de manière covalente) lié à pFDH et le taux de dissociation de NADH étant considérablement ralenti. A pH plus élevé (9,5), le taux de réduction de l'aldéhyde diminue de façon conséquente tandis que le taux de dissociation de NADH reste inchangé, permettant la prédominance du processus d'oxydation de l'aldéhyde. Ceci permet d'expliquer la valeur de pH de fonctionnement optimale (pH 8,9) obtenue par Ogushi *et al* pour l'enzyme libre¹¹⁷, mais également que le domaine de stabilité de la pFDH se situe entre 7 et 9.

En ce qui concerne la spécificité de la pFDH, le formaldéhyde est le meilleur substrat pour l'enzyme dans la série des aldéhydes, les valeurs de K_M et V_M sont respectivement 0,09 mM et 5,92 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ¹¹⁷ (Tableau I.6). La valeur de K_M augmente et V_M diminue avec l'augmentation de la longueur du groupement alkyle. Aucune activité n'a été observée pour les n-butyr-ou n-valér-aldéhyde ou les alcools comme le méthanol ou l'éthanol.

<i>Substrat</i>	<i>K_M (mM)</i>	<i>V_M ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)</i>
Formaldéhyde	0,09	5,92
Acétaldéhyde	5,8	1,54
Propionaldéhyde	47	0,09
Isobutyraldéhyde	6,2	0,75
n-Propanol	50	0,28
Aryl alcohol	100	0,05

Tableau I.6 : Paramètres cinétiques (V_M et K_M) de la formaldéhyde déshydrogénase pour divers aldéhydes et alcools¹¹⁷

III.3.6.2 Alcool oxydase

Contrairement aux bactéries chez lesquelles le métabolisme du méthanol est catalysé par des déshydrogénases, l'oxydation du méthanol chez les levures¹¹⁹⁻¹²¹ ou les champignons^{122, 123} est

catalysée par une enzyme dépendant de l'oxygène, l'alcool oxydase (AOX, EC 1.1.3.13). Il s'agit d'une enzyme appartenant à la famille des oxydoréductases (EC 1), agissant sur les groupements donneurs CH-OH qui utilise l'oxygène O₂ comme accepteur d'électrons et qui catalyse principalement l'oxydation des alcools à chaînes courtes.

Cette enzyme est un homooctamère, composé de sous-unités identiques donc la masse moléculaire de chacune se trouve dans les 74-83 kDa. Elles sont disposées selon une orientation quasi-cubique et chacune contient une molécule de FAD (Fig.1.31), liée de façon non covalente à l'enzyme^{119, 121, 124}. Contrairement aux déshydrogénases NAD⁺-dépendantes, le recyclage de coenzyme n'est pas nécessaire.

L'alcool oxydase contenant la FAD comme coenzyme catalyse l'oxydation des alcools à chaîne courte (essentiellement méthanol et éthanol) en réduisant d'abord le complexe AOX-FAD en présence du substrat pour former le produit ainsi que la forme hydrogénée AOX-FADH₂ qui est ensuite ré-oxydée par l'oxygène moléculaire avec formation de peroxyde d'hydrogène selon la réaction (Eq.I.54).



L'affinité de l'enzyme pour les alcools diminue avec l'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle, sauf dans le cas de l'AOX issue du champignon *Paecilomyces variotii*¹²⁴ dont l'activité vis-à-vis du méthanol est légèrement plus élevée que celle vis-à-vis de l'éthanol (Tableau I.7). Une absence d'activité a été observée pour des alcools de longueur de chaîne alkyle plus longue que C₅, les alcools secondaires ou tertiaires et les alcools aromatiques¹¹⁹.

L'AOX est également connue pour sa réactivité vis-à-vis du formaldéhyde. Puisque ce dernier est quasi totalement hydraté en solution aqueuse, le formaldéhyde peut être considéré chimiquement comme l'équivalent chimique d'un alcool. L'alcool oxydase oxyde le formaldéhyde en acide formique^{119, 121, 124}. Des travaux réalisés par Kato *et al.*¹¹⁹ ont montré que le site actif de l'enzyme impliqué dans l'oxydation des alcools et du formaldéhyde est commun. Cette activité vis-à-vis des aldéhydes est très peu discutée dans la littérature et elle est généralement considérée comme faible comparée à celle vis-à-vis du méthanol ou de l'éthanol. Dans le cas de l'alcool oxydase non commerciale isolée du champignon *Paecilomyces variotii* IRI017¹²⁴, elle est de l'ordre de 28 % de celle observée pour le méthanol et l'éthanol, tandis qu'elle est d'environ 5 % pour l'acétaldéhyde. En ce qui concerne l'enzyme issue de la levure *Hansenula polymorpha*, l'affinité pour le formaldéhyde est encore plus faible, 10 % par rapport à celle pour le méthanol, et la valeur de K_M est de 2,6 mM¹¹⁹.

Substrat	Activité relative (%)			
	<i>Hansenula polymorpha</i> ¹¹⁹	<i>Pichia pastoris</i> ¹²⁵	<i>Candida boidinii</i> ¹²¹	<i>Paecilomyces variotii</i> ¹²⁵
Méthanol	100	100	100	100
Ethanol	49,8	82	78	106
1- Propanol	44,2	43	32	33
1- Butanol	3,19	20	17	-

Tableau I.7: Activités relatives des alcools oxydases extraites de différentes souches de levure et de champignon pour divers alcools.
L'activité pour le méthanol est arbitrairement fixée à 100 % pour chaque souche

L'activité de l'AOX est généralement optimale dans le domaine de pH entre 8 et 9 et les enzymes sont stables sur une large plage de pH entre 6 et 10¹²⁴. Toutefois, la présence du produit issu de la réaction enzymatique, le peroxyde d'hydrogène, affecte considérablement l'activité ainsi que la stabilité de l'AOX^{119, 124-126}. Cette diminution d'activité, voire l'inactivation de l'AOX par H₂O₂, est probablement due à l'oxydation des groupements essentiels –SH¹²⁵. Une des méthodes la plus simple permettant de surmonter cette difficulté est d'imiter la nature, en couplant par exemple l'AOX à une autre enzyme pour faire disparaître ce composé. Dans les cellules de levure ou les organites spécifiques, la catalase, une enzyme appartenant à la famille des peroxydases qui catalyse la dégradation de H₂O₂ en H₂O et ½ O₂, est produite en réponse au méthanol^{119, 125}.

I.3.6.3 Lactate oxydase (LOX)

Il existe au moins deux types différents d'enzymes qui oxydent le L-lactate et utilisent l'oxygène moléculaire (O₂) en tant qu'accepteur d'électrons. Elles appartiennent toutes les deux à la famille des flavoprotéines qui catalysent l'oxydation des α -hydroxy-acides¹²⁷. Elles possèdent la structure soit d'un tétramère¹²⁸, soit d'un octamère¹²⁹ dont les sous-unités identiques ont des masses comprises entre 41000¹²⁸ et 47000 kDa¹²⁹. Chaque sous unité contient une molécule de coenzyme flavine-mononucléotide (FMN) (Fig.I.42) qui joue un rôle important dans le mécanisme de catalyse.

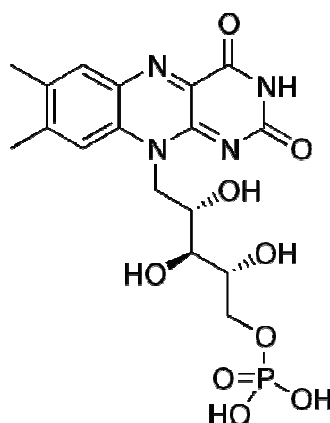


Fig.I.42 : Structure chimique de la flavine-mononucléotide (FMN)

La réaction catalysée par le premier type d'enzyme, la S-2-Hydroxide-acide oxydase; EC 1.1.3.15, transforme le groupement 2-hydroxy acide carboxylique du lactate en 2-ceto acide carboxylique, conduisant à la production de pyruvate et de peroxyde d'hydrogène (Eq.I.55). Ce groupe comporte essentiellement la lactate oxydase (ancien numéro : EC 1.1.3.2) et la glycolate oxydase, (ancien numéro : EC 1.1.3.1). Elles se différencient principalement par leur origine ainsi que par leur spécificité. La première enzyme est souvent extraite à partir de souches de bactéries telles que *Pediococcus sp.* ou *Aerococcus viridans*¹³⁰⁻¹³² et possède une affinité stéréo-sélective pour le L-lactate. La seconde est une enzyme habituellement trouvée dans les feuilles de plantes vertes ou les cellules de mammifères¹³³ et elle catalyse l'oxydation de l'acide glycolique avec une vitesse trois fois plus grande (à pH optimal) que celle de l'acide lactique.

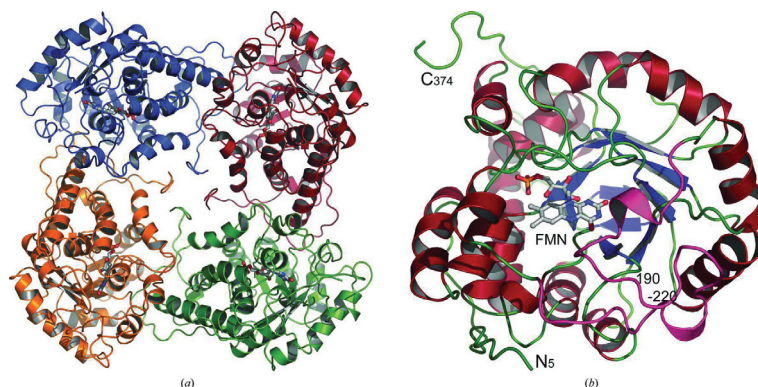
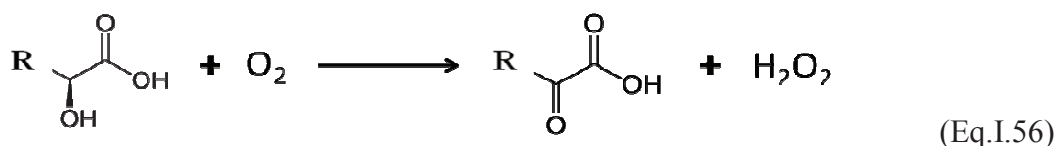
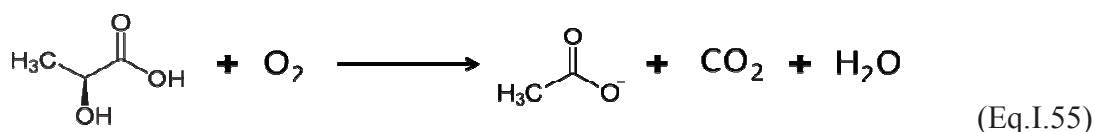


Fig.1.43 : Structure générale de la L-lactate oxydase extraite de *A. viridans*.
(a) Structure du tétramère
(b) Structure des monomères vue de côté dans le site actif où le cofacteur FMN est situé

Le deuxième type d'enzyme, produit notamment par les mycobactéries *Mycobacterium smegmatis*^{134, 135}, catalyse l'oxydation et la décarboxylation du lactate en acétate (CH_3COO^-) et en dioxyde de carbone (CO_2) avec réduction d' O_2 en H_2O (Eq.I.55). Du fait de ce mécanisme, l'enzyme a été nommée plus spécifiquement lactate 2-monooxygénase (numéro : EC 1.12.12.4). Néanmoins, quand ce catalyseur se trouve dans l'environnement cellulaire, notamment dans les conditions anaérobies, les produits issus de la réaction ne sont plus ceux mentionnés auparavant, et on retrouve le pyruvate et peroxyde d'hydrogène (Eq.I.56)^{135, 136}.



La différence de mécanisme catalytique entre ces deux principaux groupes d'enzymes (Lactate 2-monooxygénase et S-2-Hydroxyde-acide oxydase) a été le sujet de nombreuses recherches. Il semble que cette différence se base essentiellement sur le complexe intermédiaire entre l'enzyme et le pyruvate^{135, 127}, notamment dans la stabilité du complexe enzyme réduite-pyruvate, qui se dissocie environ 7000 fois plus vite avec la lactate oxydase qu'avec le lactate 2-monooxygénase (Fig.I.44). Dans le cas de la monooxygénase, la liaison du pyruvate à l'enzyme réduite ainsi que sa libération du complexe sont des processus très lents. Le pyruvate et le peroxyde d'hydrogène s'accumulent au niveau du site actif entraînant la décarboxylation quantitative du pyruvate par H₂O₂ et la libération des produits finaux, (acétate, eau et CO₂)¹³⁷. En revanche, avec la lactate oxydase ou la S-2-Hydroxyde-acide oxydase, le pyruvate est libéré plus rapidement de son complexe permettant son oxydation relativement rapide avec O₂.

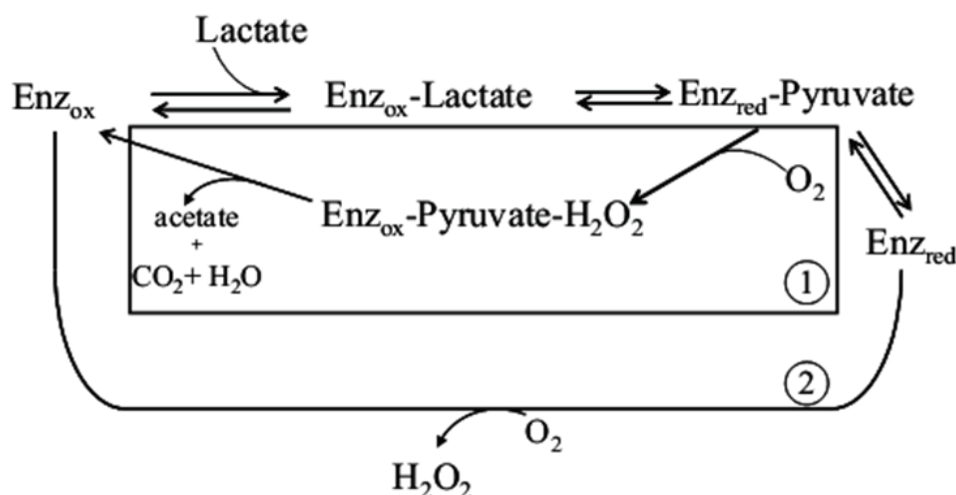


Fig.I.44: Mécanismes rapportés pour l'oxydation enzymatique du L-lactate par la L-lactate oxydase (voie 1) et la L-lactate monooxygénase (voie 2)¹²⁷

I.3.6.4 Peroxydase de raifort (horseradish peroxidase HRP)

Les peroxydases, EC 1.11.1.7, sont des enzymes omniprésentes dans les plantes, les champignons, les bactéries, mais aussi chez les mammifères. Elles sont impliquées dans divers processus biologiques qui comprennent à la fois la synthèse de la paroi cellulaire, la dégradation, la réponse au stress, la signalisation pendant le stress oxydatif et l'élimination des xénobiotiques¹³⁸.

Ces enzymes catalysent les réactions d'oxydoréduction faisant intervenir un peroxyde (par exemple ROOR' ou H₂O₂) comme oxydant :



La réaction la plus simple est la dismutation du peroxyde d'hydrogène :



Parmi les peroxydases, l'enzyme la plus connue est celle extraite à partir de la racine d'une plante, le raifort, *Armoracia rusticana*. Il s'agit d'une plante vivace cultivée dans les régions tempérées du monde, connue principalement pour les vertus culinaires de ses racines¹³⁹.

La peroxydase de raifort (HRP) appartient à la classe III de la superfamille des peroxydases qui comprennent les peroxydases d'origine bactérienne, fongique et végétale. Dans la littérature, le terme de « peroxydase de raifort » est générique. En effet, il existe dans la racine de cette plante 30 enzymes présentant des séquences d'acides aminés différentes mais catalysant la même réaction chimique. Elles peuvent être classées selon leur point isoélectrique comme isoenzymes acides, neutres ou basiques¹⁴⁰. Parmi ces enzymes, l'isoenzyme neutre C (HRP C) est la plus abondante^{139, 140}. Elle comporte une séquence unique de 308 résidus d'acides aminés ainsi que deux types de centre métallique : l'hème, un cofacteur composé d'un atome de fer contenu dans le centre d'un grand noyau hétérocyclique organique et deux atomes de calcium qui sont essentiels pour la structure et les fonctions de l'enzyme (Fig.I.45). La perte de ces deux atomes de calcium se traduit par la diminution de l'activité et de la stabilité thermique de l'enzyme¹³⁹.

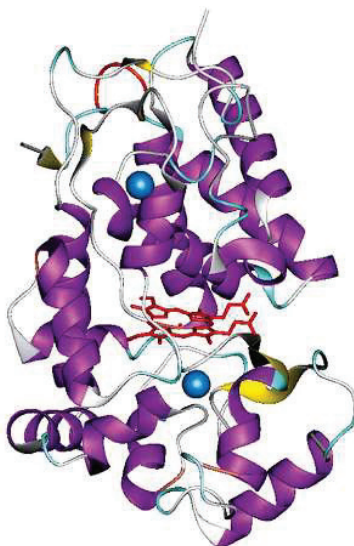


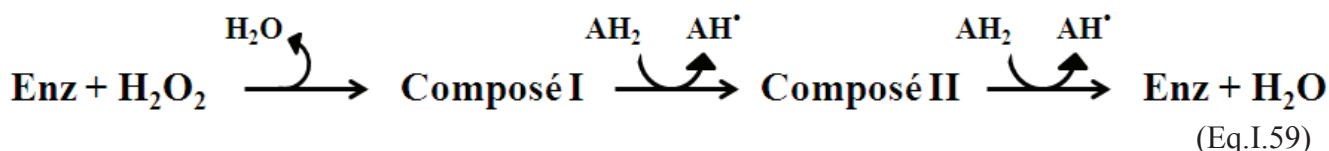
Fig.I.45 : Représentation en 3D de la structure cristalline aux rayons X de l'isoenzyme C peroxydase de raifort.
En rouge : le groupe hème ; en bleu : les deux atomes de calcium

Les réactions catalysées par la HRP se déroulent généralement en trois étapes distinctes^{138, 141} (Eq.I.59):

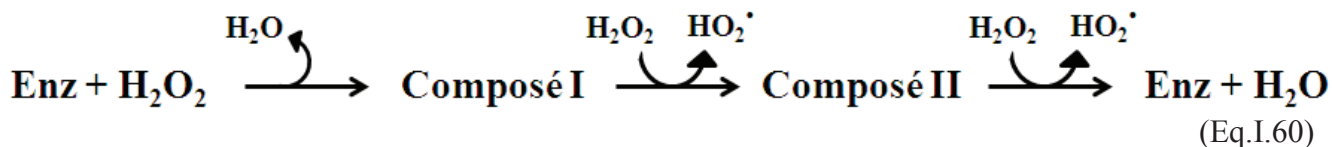
- La liaison de H_2O_2 (ou un autre hydroperoxyde, ROOR') à l'hème, Fe étant à l'état trivalent, suivie par le clivage hétérolytique de la liaison oxygène-oxygène de H_2O_2 . Une molécule

d'eau est libérée au cours de cette réaction avec oxydation simultanée de l'hème pour former un intermédiaire (composé I). Le composé I n'est pas un complexe classique enzyme-substrat, mais plutôt un intermédiaire réactif avec un état d'oxydation supérieur (5 comparativement à 3 pour l'enzyme de repos),

- Le composé I est capable d'oxyder une gamme de substrats réducteurs par un mécanisme impliquant deux étapes séquentielles à électron unique et être reconverti en l'enzyme au repos. Lors de la première réduction, on obtient un second intermédiaire d'enzyme, le composé II, qui conserve l'hème à l'état oxydation IV,
- Ce composé II est ensuite réduit en l'enzyme native (E) par une seconde molécule de substrat réducteur (AH₂).



En absence de ce substrat AH₂, c'est H₂O₂ qui assure un double rôle, comme oxydant dans la formation du composé I et comme substrat donneur d'électrons (réduction) pour la peroxydase :



Cependant il est à noter que le mécanisme n'est pas forcément aussi simple que celui décrit par l'équation précédente (Eq.I.60). Des auteurs ont montré que l'étape finale au cours de laquelle le composé II est réduit est très lente et une autre espèce intermédiaire (composé III) a pu être identifiée par spectroscopie. Une activité de type catalase, qui libère de l'oxygène, a par ailleurs été observée. Enfin, il semble que l'enzyme soit progressivement inactivée du fait de sa transformation en verdohémoprotéine dépourvue d'activité catalytique¹⁴¹.

I.4 Utilisation des enzymes dans le développement de biocapteurs

Ainsi que nous l'avons brièvement présenté dans le paragraphe traitant de la classification des biocapteurs, l'utilisation d'une fine membrane enzymatique peut être le siège de la conversion d'un substrat en un produit détectable au niveau du transducteur en contact direct avec cette couche sensible. La sensibilité et la sélectivité du biocapteur dépend de l'affinité du composant biologique

pour le substrat mais également des propriétés physico-chimiques du transducteur. Une inhibition de l'enzyme conduisant à une inactivation du processus réactionnel peut être également mise à profit pour la mise en évidence de la présence de substances toxiques dans un milieu complexe^{142, 143}.

Dans la littérature, il est possible de trouver un très nombre d'exemples de biocapteurs enzymatiques. On peut citer les biocapteurs à cholestérol oxydase pour la détection du cholestérol, les biocapteurs à glucose oxydase pour la détection du glucose, etc ...^{36, 38, 39}. L'utilisation d'enzymes présente de multiples avantages. En effet, il s'agit tout d'abord d'entités faciles à produire dont les propriétés catalytiques et la spécificité peuvent être améliorées par ingénierie génétique. La réponse du biocapteur peut par ailleurs être amplifiée par modulation de leur activité vis-à-vis des analytes cibles. Néanmoins, il existe certaines limitations à l'emploi des enzymes en tant que biorécepteurs. En effet, des étapes préliminaires de purification et de conservation sont nécessaires, engendrant ainsi des contraintes économiques conséquentes. De plus, la stabilité dans le temps des enzymes, leur besoin en cofacteurs de même que leur fragilité lorsqu'elles sont extraites de leur milieu naturel, peuvent être limitantes^{144, 145}.

De nombreux progrès ont pu être réalisés afin de remédier à ces inconvénients. Ainsi, des modifications génétiques ont été réalisées au niveau des microorganismes sécrétant de certaines enzymes pour améliorer la sensibilité des essais ainsi que la stabilité et le temps de demi-vie de ces enzymes. De même, des interfaces électrochimiques et des médiateurs électrochimiques performants ont été développés¹⁴⁵. A titre d'exemple, une acétylcholinestérase produite après modification génétique à partir de *Drosophila melanogaster* s'est avérée beaucoup plus performante pour l'analyse des insecticides que celle disponible dans le commerce et extraite d'*Electrophorus electricus*¹⁴⁶.

L'utilisation de nanomatériaux a considérablement contribué à l'amélioration des biocapteurs enzymatiques en optimisant à la fois la surface de contact et l'activité catalytique. Par exemple, la mesure du peroxyde d'hydrogène produit lors de la catalyse de l'acétylcholine par un biocapteur à acétylcholinestérase-choline oxydase a été fortement améliorée par insertion de nanotubes de carbone à l'intérieur de l'électrode¹⁴⁷ assurant ainsi la détection d'une large gamme d'insecticides organophosphorés. D'autre part, des techniques d'immobilisation innovantes ont été développées afin de remédier à l'instabilité des enzymes utilisées au niveau des biocapteurs. Afin de garantir la meilleure sensibilité de détection, la fixation de l'enzyme doit avoir lieu au niveau de la zone active du capteur. Elle doit par ailleurs préserver l'activité de l'enzyme tout en assurant une bonne diffusion de l'analyte vers le site actif. La silice préparée par voie sol-gel constitue un bon exemple de matrice d'immobilisation qui permet d'améliorer la stabilité thermique des enzymes et leur adaptation aux conditions physiques et chimiques requises pour certaines analyses environnementales. Une

procédure de co-immobilisation de l'uréase et d'un indicateur de pH fluorescent dans une matrice sol-gel a permis, grâce à l'inhibition de l'activité enzymatique, de détecter Cu(II) et Cd(II) à des concentrations respectives de 20 et 230 μM ¹⁴⁸.

I.4.1 Immobilisation des enzymes

L'un des points les plus critiques dans la conception des biocapteurs est l'immobilisation du biorécepteur sur le transducteur. Plusieurs critères de sélection tels que le type de matériel biologique, le substrat à analyser ainsi que la configuration du transducteur doivent être pris en compte pour le choix de la technique d'immobilisation, l'objectif étant de garantir l'accessibilité au substrat, une réactivité maximale du biorécepteur et une stabilité suffisante permettant une réutilisation éventuelle du biocapteur. La technique d'immobilisation retenue ne doit pas perturber de manière importante les performances de l'élément biologique et ainsi ne pas conduire à une diminution de l'activité ou provoquer la dénaturation des enzymes¹⁴⁹. Il existe plusieurs techniques d'immobilisation que l'on peut subdiviser en procédés physiques et en procédés chimiques (Fig.I.46).

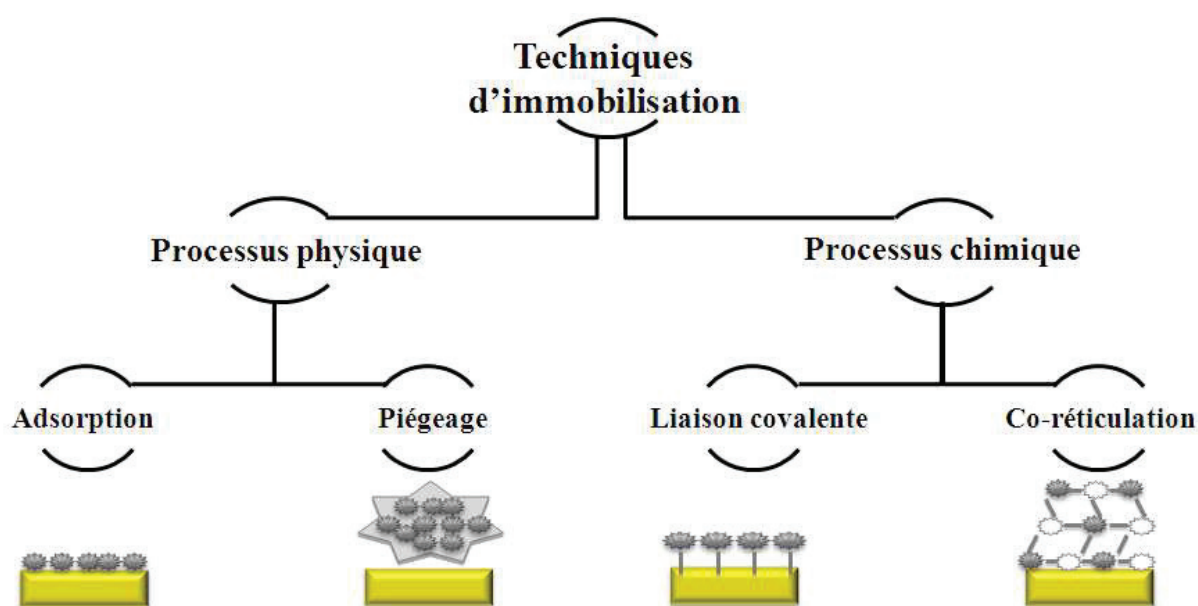


Fig.I.46: Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation de l'enzyme

Les avantages et inconvénients des différentes techniques d'immobilisation sont résumés dans le tableau I.8.

Méthode	Avantages	Inconvénients
<i>Adsorption</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Facile à réaliser - Traitement peu dénaturant 	<ul style="list-style-type: none"> - Fixation très fragile - Désorption facile lors d'une variation de pH, de force ionique ou de température
<i>Piégeage</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Traitement peu dénaturant 	<ul style="list-style-type: none"> - Contraintes diffusionnelles - Relargage possible de l'enzyme
<i>Liaisons covalentes</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Faibles contraintes diffusionnelles - Liaisons fortes entre le bioélément et la surface de transducteur 	<ul style="list-style-type: none"> - Toxicité des molécules chimiques utilisées
<i>Réticulation</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Utilisation conjointe à la rétention physique pour éviter le relargage 	<ul style="list-style-type: none"> - Toxicité des molécules chimiques utilisées - Contraintes diffusionnelles

Tableau I.8: Avantages et inconvénients des différentes techniques d'immobilisation

I.4.1.1. Méthodes physiques d'immobilisation

Adsorption

L'adsorption physique est l'une des méthodes d'immobilisation les plus simples et non dénaturantes permettant de fixer des éléments de reconnaissance au niveau d'un transducteur. Cette méthode se base sur l'établissement d'interactions de faible énergie de type ionique, polaire ou hydrophobe, ou encore de liaisons hydrogènes entre le biorécepteur et un support non soluble, par l'intermédiaire d'un matériau actif tel qu'une résine échangeuse d'ions anionique ou cationique¹⁵⁰, du charbon actif, de l'argile, de l'oxyde de l'aluminium, du verre poreux, des céramiques ou des nanoparticules^{38, 151}.

Malgré sa simplicité de mise en œuvre, cette technique demeure très peu utilisée pour la conception des biocapteurs, car les éléments immobilisés peuvent facilement se désorber sous l'action d'une variation de pH, de température, de concentration en substrat ou de force ionique¹⁴⁴. La stabilité et la durée de vie des biocapteurs sont donc diminuées. De plus, afin d'assurer une bonne adsorption, la surface d'électrode doit être absolument propre, ce qui requiert une longue étape de nettoyage préalable¹⁵².

Piégeage

Ces techniques consistent à piéger le biorécepteur dans un matériau d'origine organique ou inorganique. Les entités biologiques peuvent être mélangées au matériau, puis déposées à la surface du transducteur, immobilisées à l'intérieur d'un réseau polymérique lors de sa synthèse en surface du capteur ou confinées derrière une membrane. La maille de la matrice ou de la membrane assurent de manière purement physique la rétention de ces molécules tout en permettant la circulation du substrat et du produit de la réaction vers le site actif. La sélectivité est maintenue grâce au contrôle de la porosité du matériau ainsi que de ses propriétés chimiques.

La nature de ces matériaux est très variée. Il existe des gels ou des polymères chimiques ou biologiques insolubles tels que l'alginate, la carraghénane, la silice, l'agarose, le chitosane, la gélatine, le polyacrylamide, le polyéthylène glycol, l'alcool polyvinylique, ...^{149, 153, 154}. La micro-encapsulation dans des billes de verres poreuses^{153, 154} ou le piégeage dans des membranes de dialyse⁴⁰ ou de filtration¹⁵⁵ a également été proposée.

L'inconvénient majeur de ce type de technique réside dans l'établissement d'une résistance diffusionnelle supplémentaire qui peut se traduire par une diminution de la vitesse de réponse du biocapteur¹⁴⁴. L'activité des biomolécules par ailleurs devient fortement dépendante de l'environnement local (pH, force ionique, etc.) et l'accès du substrat au site actif de l'enzyme peut se trouver également limité. Les propriétés de gonflement des hydrogels peuvent s'avérer également gênantes dans certains cas et provoquer le décollement du biomatériau de la surface du transducteur ou le relargage du biorécepteur.

Cas de l'immobilisation par le Nafion®

Le Nafion® est un copolymère de tétrafluoroéthylène et de perfluoro(4-méthyl-3,6,-dioxaoct-7-ene) acide sulfonique développé dans les années 1960 par la société DuPont¹⁵⁶. Il s'agit du premier polymère synthétique de la catégorie des ionomères (Fig.I.47).

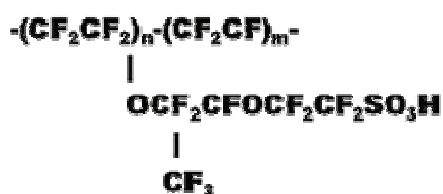


Fig.I.47: Structure chimique du Nafion

Les premiers développements réalisés dans le domaine des ionomères perfluorosulfonates de Nafion® avaient comme objectif de réaliser des membranes permselectives pour les cellules électrochimiques utilisées à l'échelle industrielle dans la production de NaOH, KOH et Cl₂. A

présent, le Nafion® est essentiellement utilisé comme membrane échangeuse de protons dans les piles à combustible. Il combine la stabilité chimique, thermique et oxydative des polymères perfluorés tels que le polytétrafluoroéthylène (PTFE) aux propriétés des acides forts dues au groupement acide sulfonique fluoré. Comme le Teflon®, le Nafion® est extrêmement résistant aux attaques chimiques ce qui lui permet de ne pas libérer des fragments ou des produits de dégradation dans le milieu environnant. Il résiste également à haute température. Dans certaines applications, le Nafion® peut être utilisé à des températures allant jusqu'à 190°C. Le Nafion® est par ailleurs un excellent conducteur d'ions, avec une très forte sélectivité vis-à-vis des anions, et il est biocompatible.

On peut grossièrement distinguer trois principaux domaines dans le Nafion:

- un domaine hydrophobe semi-cristallin continu constitué des chaînes de polytétrafluoroéthylène.
- un cluster hydrophile de groupements sulfonates et leurs contre-ions (30-50 nm) qui gonfle et change de taille ou de forme avec la teneur en eau, et forme ainsi un réseau continu permettant le transport de l'eau et des ions.
- un domaine interfacial d'hydrophobie intermédiaire.

Cependant, malgré le grand nombre d'études réalisées et de modèles proposés, la microstructure du Nafion®, à l'origine de ses propriétés particulières, reste un sujet de controverse¹⁵⁷⁻¹⁵⁹. Le premier modèle morphologique de Nafion®, et certainement le plus utilisé, est celui de Geirke¹⁵⁷. Il suppose que les forces dipolaires créées par les paires d'ions forment des agrégats ioniques, nommés les clusters ioniques. Cette force entre en compétition avec la force élastique des chaînes de polymère. Lors de la formation des clusters sphériques, les chaînes de polymères sont étirées et agissent comme un frein à l'agrégation des ions, limitant la taille des agrégats à quelques angströms (Å). Les clusters sont reliés par des canaux qui permettent la circulation des protons, à l'origine de la conductivité du Nafion® et de ses propriétés de transport permselectif. L'hydratation provoque une augmentation du diamètre des clusters et la diminution de leur nombre (Fig.I.48).

Le Nafion® possède des propriétés intéressantes pour l'immobilisation d'enzymes à la surface d'une électrode. L'immobilisation peut se faire de trois manières différentes :

- Le polymère peut tout d'abord être déposé sur la surface de l'électrode avant que les enzymes n'y soit fixées¹⁶⁰. Le problème de cette procédure est qu'elle soumet directement l'enzyme à l'environnement chimique de la matrice et conduit généralement à une baisse de son activité,
- Le deuxième type d'immobilisation consiste à piéger les enzymes entre une membrane de Nafion® et l'électrode. Cette opération est généralement réalisée par un premier dépôt d'une solution d'enzyme ou par l'électro-polymérisation d'un polymère conducteur en présence de

l'enzyme sur la surface sensible de l'électrode suivi par l'ajout d'une solution de Nafion®. Cette procédure a été abondamment utilisée¹⁶¹⁻¹⁶⁴,

- Le troisième type d'immobilisation consiste à piéger l'enzyme dans la membrane Nafion®^{165, 166}. Cependant, piéger directement les enzymes à la surface de l'électrode par la membrane Nafion® préparée à partir de la solution commerciale sous forme acide a pour conséquence de diminuer la durée de vie et l'activité de l'enzyme. Cette difficulté peut être surmontée par dilution de la solution commerciale suivie de sa neutralisation. Néanmoins, dans le cas où la réaction enzymatique produit des protons (cas des déhydrogénases), on observe la réacidification de la membrane de Nafion®, ce qui peut diminuer l'activité des enzymes. Moore *et al*¹⁶⁷ ont proposé d'utiliser des ions tétraalkylammoniums comme contre-ions des sulfonates.

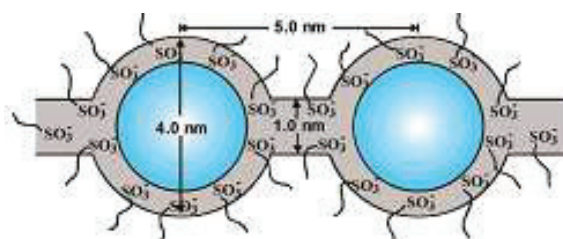


Fig.I.48: Modèle du réseau de « cluster » pour la morphologie du Nafion® hydraté¹⁵⁷

I.4.1.2 Méthodes chimiques d'immobilisation

Liaison covalente

Cette technique consiste en la formation de liaisons covalentes stables entre l'enzyme et le support. Les groupements ne doivent pas être nécessaires pour l'activité catalytique ou être situés trop près du site actif. Il peut s'agir de groupements amines, carboxyles ou sulfhydryles des biomolécules et des transducteurs porteurs de groupements amines, époxy ou tosyles^{149, 153}. Une activation du support portant soit des groupements amines soit des groupements carboxyliques permet par exemple la formation de liaisons amides, respectivement, avec les fonctions carboxyliques ou amines de l'enzyme¹⁴⁹. Néanmoins, l'exposition à des conditions chimiques agressives affecte la viabilité et l'activité cellulaire et peut entraîner la perte en enzymes intracellulaires. Cette technique est donc peu favorable à l'immobilisation de cellules entières¹⁴⁴.

Réticulation

La technique de co-réticulation repose sur l'interaction entre l'enzyme, une protéine inerte, appelée « protéine de charge », et un agent bifonctionnel, le plus connu étant le glutaraldéhyde¹⁶⁸ pour créer un réseau renforçant la cohésion de la membrane.

La réticulation des enzymes peut être réalisée directement au niveau du transducteur ou au niveau d'une membrane qui sera placée par la suite au niveau du transducteur¹⁴⁴. Cette méthode est facile à mettre en œuvre et on observe une bonne stabilité des édifices ainsi obtenus. Cependant, la constitution d'un réseau tridimensionnel peut limiter la diffusion de l'analyte et diminuer la cinétique enzymatique. De plus, la réaction chimique peut être à l'origine d'un changement de conformation de l'enzyme, provoquant une perte d'activité de la membrane co-réticulée¹⁴⁹. Le choix de la technique d'immobilisation dépend de la nature de l'enzyme, du transducteur et de l'environnement dans lequel le biocapteur fonctionne. Il dépend aussi des stabilités mécaniques et chimiques de la matrice et de son coût. La meilleure technique, d'après Bowers, n'existe pas¹⁶⁹.

Cas de la réticulation par le glutaraldéhyde

Le glutaraldéhyde est un membre de la famille des aldéhydes. En fait, il s'agit d'un dialdéhyde sous forme liquide huileux, incolore et très odorant. Il est principalement disponible commercialement sous forme acide en solution aqueuse de pH compris entre 3,0 et 4,0. Comme mentionné dans le paragraphe précédent, le glutaraldéhyde (GA) possède une place importante dans le classement des agents de réticulation du fait de sa fiabilité, son faible coût et sa facilité d'utilisation. Le GA est le réactif de choix dans les cas nécessitant une immobilisation rapide et sûre de protéines.

Le glutaraldéhyde présente une chimie complexe en milieu aqueux¹⁶⁸. Il a ainsi été montré que la solution aqueuse commerciale de GA (25 ou 70 %) est constituée d'un mélange de plusieurs formes de ce réactif (Fig.I.49). Les différentes formes de GA dépendent des conditions en solution. Il existe le GA libre (I), la forme linéaire monohydrate (II) et dihydrate (III), héli-acétal cyclique (IV) et des oligomères (V)... Dans les solutions acides et neutres le GA existe comme monomère, en sa forme d'aldéhyde libre, hydraté ou héli-acétal. A des concentrations élevées, il polymérise pour former des oligomères héli-acétals.

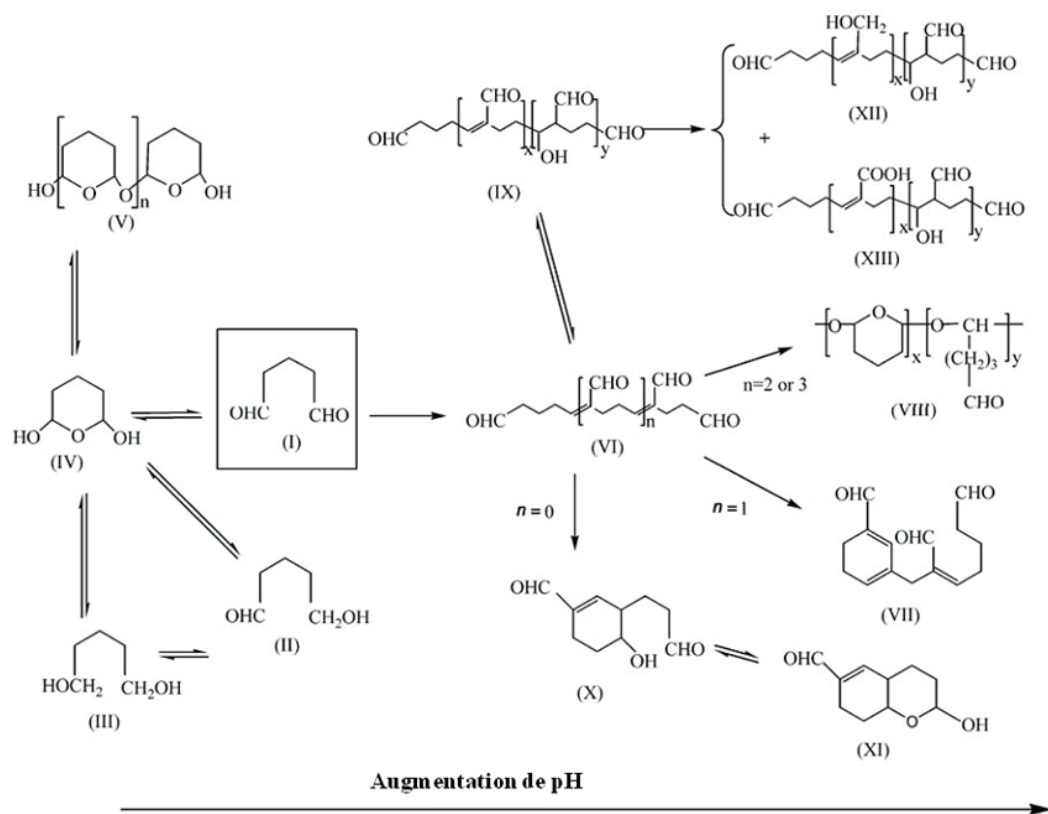


Fig.I.49: Résumé des formes possibles du glutaraldéhyde en solution aqueuse

Toutes ces formes de GA peuvent réagir avec les enzymes, ceci de différentes manières, et conduire à leur immobilisation. La figure I.50 montre les produits du couplage des enzymes avec le GA selon la forme et les conditions dans lesquelles il se trouve¹⁷⁰.

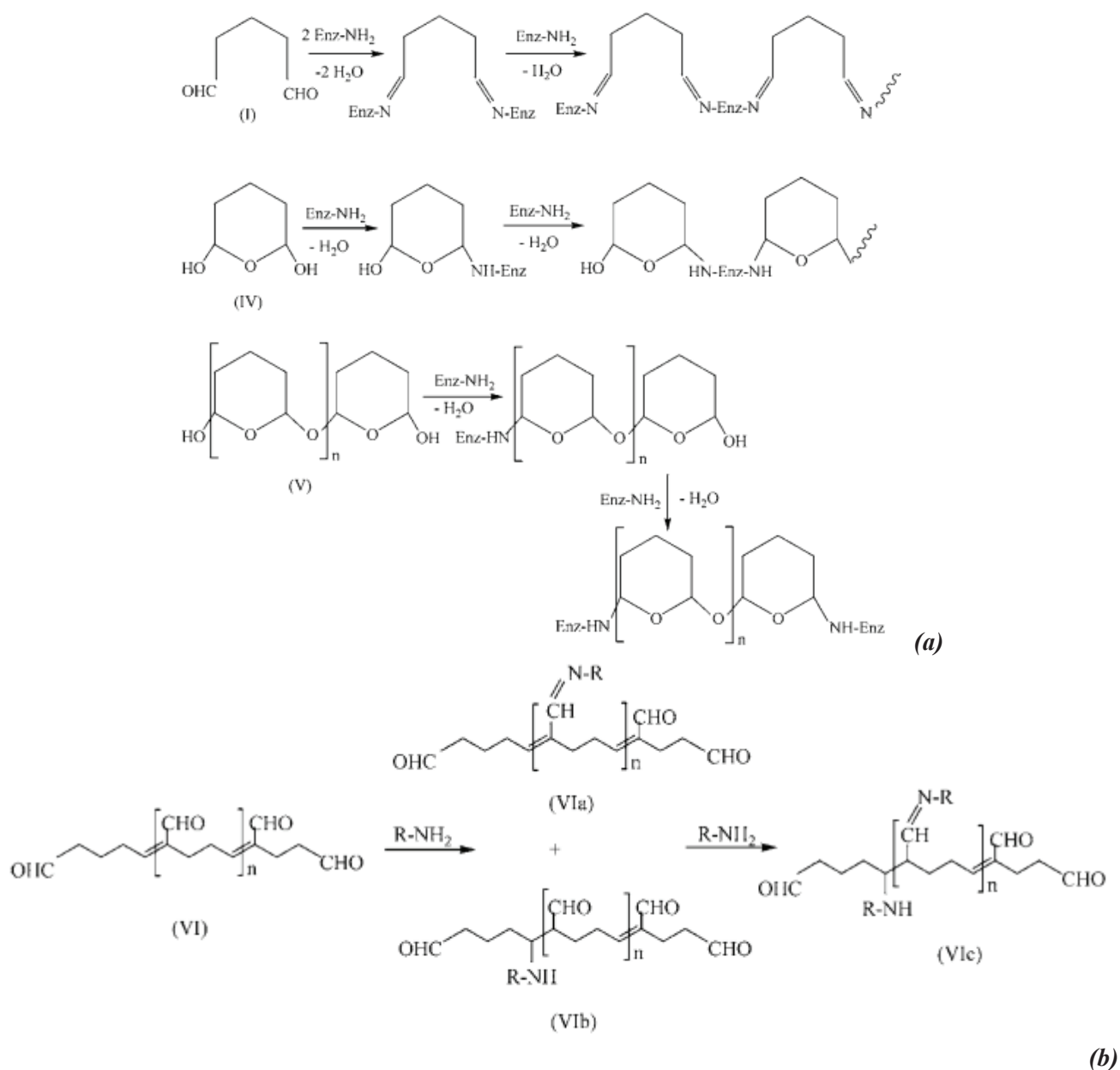


Fig.I.50: Réactions des enzymes avec le glutaraldéhyde dans des conditions acides (a) et basiques(b)

La réticulation des enzymes avec le GA se déroule généralement dans une solution tampon aqueuse dans des conditions de pH, de force ionique et de température proches des conditions physiologiques, permettant ainsi une bonne stabilisation des composants biologiques¹⁶⁸. Celle-ci est obtenue soit par formation d'un réseau tridimensionnel grâce à la création de liaisons intermoléculaires entre molécules d'enzymes, soit par liaisons à un support insoluble, tel que le nylon ou la silice fondue, soit par co-réticulation avec des protéines inertes telles que la gélatine ou l'albumine de sérum bovin (BSA). Ce dernier reste l'agent de co-réticulation le plus utilisé pour l'immobilisation des enzymes en vue de l'élaboration de biocapteurs. C'est une protéine riche en lysine (59 molécules), acide aminé qui joue un rôle important dans l'insolubilisation du réseau 3D

formé entre l'enzyme, le GA et la BSA. L'ajout de BSA est d'autant plus important que la taille des enzymes est petite.

Toutefois, il est primordial lors de l'étape d'immobilisation de bien contrôler les paramètres tels que le pH, la force ionique¹⁶⁸. Une trop faible concentration en glutaraldéhyde favorise la formation de liaisons intramoléculaires, empêchant la constitution de la membrane et provoquant la précipitation de l'enzyme. Par contre, une trop forte quantité peut entraîner un changement de conformation de l'enzyme, en particulier, une déformation de la structure du site actif. Cette distorsion peut limiter l'accessibilité et l'adaptation du substrat, ce qui affecte le maintien de l'activité biologique.

Le glutaraldéhyde a été largement utilisé pour le développement de biocapteurs. Il est souvent employé sous sa forme liquide mélangé directement avec les biomolécules^{21, 171-173}. Toutefois, il est possible également d'utiliser ce réactif sous forme de vapeur saturée^{174, 175}. Dans une étude, Li *et al.* ont comparé différents modes d'immobilisation de l'acétylcholinestérase pour le développement de biocapteurs ampérométriques¹⁷⁶. Ils ont pu montrer que les vapeurs de GA conduisaient à de meilleurs résultats que la forme liquide. La même conclusion a été obtenue par Chang *et al.* pour un biocapteur utilisant la L-glutamate oxydase comme élément de reconnaissance¹⁷⁷. Ces résultats peuvent être attribués au fait que les conditions expérimentales sont plus douces en présence de vapeur (effet de dilution).

I.4.1.3 Ajout de nanomatériaux

Ces dernières années, le domaine des nanotechnologies s'est développé de façon considérable. Ce domaine comporte l'étude, la manipulation, la création et l'utilisation de matériaux, de dispositifs ou de manière plus générale de systèmes dont les dimensions sont inférieures à 100 nm. En ce qui concerne les biocapteurs, la nanotechnologie joue un rôle de plus en plus important aussi bien au niveau de leur miniaturisation que du développement de nouveaux systèmes d'immobilisation des biorécepteurs¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Les nanomatériaux tels que les nanoparticules ou les nanofils métalliques, les quantum dots ou les nanotubes de carbone présentent des propriétés catalytiques, optiques ou électroniques particulièrement intéressantes. Ils peuvent être préparés et manipulés relativement facilement et présentent une réactivité généralement élevée ainsi qu'une importante surface développée. Les nanomatériaux sont actuellement employés dans de nombreux domaines tels que l'électronique, la médecine, la pharmacie, la cosmétique, l'analyse environnementale, la catalyse et la science des matériaux, et d'une manière intensive de nos jours dans le domaine des biocapteurs¹⁸¹⁻¹⁸⁴.

Leur taille est proche de celle de biomolécules comme les enzymes, les anticorps ou les acides nucléiques, rendant possible la synthèse de nouveaux systèmes hybrides pouvant combiner à la fois les propriétés optiques ou électroniques uniques des nanomatériaux avec les propriétés sélectives des biomolécules. De nombreuses revues ont été consacrées ces dernières années à l'utilisation des nanomatériaux dans le domaine des biocapteurs électrochimiques¹⁸⁵⁻¹⁸⁹ ou aux applications des enzymes immobilisées dans ou sur des nanomatériaux¹⁹⁰.

Les nanomatériaux peuvent être à base de carbone, d'oxydes de métal (zinc, fer, titane), de métaux (or, argent et fer), ou de sulfure ou sélénure de cadmium (quantum dots). Ils peuvent être fonctionnalisés afin de permettre le greffage des biorécepteurs, et de concentrer localement les espèces ciblées qui sont ensuite détectées. Cette approche permet d'une part de minimiser le problème de diffusion, d'augmenter la surface de contact avec le milieu environnant et d'accroître la densité de greffage des biomolécules, et d'autre part de maintenir la stabilité et l'activité de la biomolécule. L'utilisation de nanomatériaux fonctionnalisés permet d'augmenter la sensibilité et la stabilité des biocapteurs.

Le tableau I.9 présente quelques exemples de biocapteurs optiques ou électrochimiques développés avec des nanoparticules.

<i>Type de nanoparticules</i>	<i>Récepteur</i>	<i>Analyte</i>	<i>Mode de détection</i>	<i>Réf</i>
Au	Oligonucléotides	ADN	Ampérométrie	191
Au	Anti-IgG	IgG humain	SPR	192
Fe₃O₄	Glucose oxidase	Glucose	Voltammétrie cyclique et ampérométrie	193
Ag	Laccase	Lutéolol (Flavonoïde)	Voltammétrie à onde carrée	194
Pt	Laccase	Méthomyle (pesticide)	Voltammétrie cyclique et à onde carrée	195

Tableau I.9 : Exemples d'application des nanoparticules à l'immobilisation de biomolécules

I.4.2 Influence de l'immobilisation sur les propriétés de l'enzyme

Comme indiqué dans le paragraphe I.3.5.3., les performances catalytiques des enzymes libres en solution sont influencées par la composition du milieu (pH, nature et concentration du tampon) et

sa température. A ces paramètres vont s'ajouter (ou se substituer) ceux liés à l'étape d'immobilisation sur le transducteur lorsque les enzymes sont utilisées pour l'élaboration de biocapteurs. Le simple contact de la protéine avec la surface des transducteurs ou celle du matériau utilisé pour sa rétention peut modifier son comportement vis-à-vis de son environnement, en jouant notamment sur l'équilibre moléculaire entre l'état natif et déplié des protéines. L'ajout d'une matrice d'immobilisation et/ou la création de liaisons covalentes ou ioniques entre l'enzyme et le support vont pouvoir accentuer ce phénomène ou, au contraire, le limiter. Les changements observés ainsi que leur importance vont dépendre de la nature de l'enzyme, du matériau composant le transducteur ou la matrice d'immobilisation et de l'interface protéine/matériau/solution¹⁹⁶.

I.4.2.1 Nature de l'enzyme

Les enzymes sont de nature amphiphile puisqu'elles sont constituées d'acides aminés dont les chaînes latérales peuvent être polaires (Asp, Glu, Arg, Lys, His, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr) ou non (Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met, Trp, Cys). Les acides aminés polaires peuvent par ailleurs être chargés positivement (Arg, Lys, Hys), négativement (Asp, Glu), ou rester neutres en fonction du pH (Tableau I.3). Les chaînes latérales non polaires des acides aminés ont tendance à se rassembler vers l'intérieur de la protéine en milieu aqueux de manière à minimiser leur contact avec les molécules d'eau. Au contraire, les chaînes latérales hydrophiles se disposent plutôt à la périphérie de la protéine où elles peuvent former des liaisons hydrogènes. Cependant, certaines chaînes latérales présentant un caractère polaire sont assez longues pour avoir quelques propriétés non polaires (ex : Tyr, Thr, Arg, Lys). La répartition des acides aminés polaires, non polaires et mixtes va jouer un rôle important dans le repliement de la protéine en solution mais également sur son dépliement possible au contact de surfaces hydrophiles et hydrophobes. Des changements structuraux peuvent avoir lieu du fait de la formation de liaisons hydrogènes entre la surface hydrophile, les groupements polaires des acides aminés de l'enzyme et des molécules d'eau, résultant en une perte de la conformation de la protéine et en particulier de son site actif. Les mêmes phénomènes peuvent être également observés entre les groupements hydrophobes de l'enzyme et une surface hydrophobe. Les interactions hydrophobes provoquent une déshydratation de la surface de la protéine. Celle-ci peut alors s'étaler sur la surface et perdre sa conformation originale, ce qui peut induire une perte d'activité. Ce type de problème peut être résolu grâce à la conjugaison de l'enzyme à une petite molécule ou un polymère, typiquement des carbohydrates ou le polyéthylène glycol¹⁹⁶.

De manière similaire, la présence de charges à la surface de l'enzyme va être à l'origine d'interactions (attraction ou répulsion) avec des surfaces chargées, risquant de conduire à la distorsion de l'enzyme¹⁹⁶. Une modification chimique (neutralisation) des groupements chargés avant immobilisation a été proposée pour résoudre ce problème. Il est à noter que le pH local au voisinage de l'enzyme immobilisée peut être différent de celui de la solution. Un certain nombre d'enzymes ont montré des changements dans le pH optimal de fonctionnement après immobilisation sur des supports.

Un autre paramètre important pouvant avoir une grande influence sur la sensibilité d'une enzyme vis-à-vis de son immobilisation est sa rigidité. Il existe en effet des protéines qualifiées de « dures » et d'autres de « molles » selon la valeur de leur compressibilité moléculaire adiabatique (β_s). Les protéines dures telles que le lysozyme, la ribonucléase A ou la HRP, sont souvent moins sujettes aux changements de conformation lors de leur adsorption sur des surfaces. Au contraire, les protéines molles perdent assez facilement leurs structures secondaires et tertiaires et sont donc plus sensibles aux interactions avec le matériau de surface ainsi qu'aux variations de pH ou de température. La rigidité de ces enzymes peut être améliorée par greffage covalent sur un matériau avant dépôt sur le transducteur ou directement sur la surface du transducteur, ou par réticulation, par l'intermédiaire du GA par exemple. L'augmentation de la concentration en enzymes entraîne souvent une baisse d'activité du fait de l'encombrement stérique résultant, de la baisse de l'accessibilité du substrat au site actif, ou de la dénaturation de l'enzyme. L'effet contraire a néanmoins pu être observé dans le cas de protéines « molles » dont la flexibilité diminue à forte concentration.

Le même type d'approche peut être également utilisée pour stabiliser la structure quaternaire de certaines enzymes multimériques dont l'inactivation provient généralement de la dissociation des sous-unités qui les composent¹⁹⁷. Beaucoup d'enzymes telles que les déshydrogénases, les aldolases, les oxydases ou les catalases entrent dans cette catégorie. Une autre stratégie permettant de limiter leur dissociation consiste à provoquer leur aggrégation puis leur réticulation¹⁹⁸, ou à les recouvrir de polymères ioniques tels que la polyéthylèneimine (PEI)¹⁹⁹. Ce polymère polycationique est en effet porteur de groupements amines ionisés capables d'interagir avec les groupements anioniques de surface de la protéine situés dans plusieurs sous-unités.

I.4.2.2 Nature du matériau composant le transducteur ou la matrice d'immobilisation

Le caractère hydrophile/hydrophobe et la charge de surface du/des matériaux utilisé(s) vont, de la même manière que ceux de l'enzyme, avoir une influence sur la distorsion de la protéine et sur

son orientation sur le support, donc potentiellement celle de son site catalytique. Ces paramètres peuvent donc affecter son activité. En théorie, le microenvironnement de l'enzyme peut être modulé et optimisé en changeant la polarité et/ou la charge de surface du matériau. Un espaceur peut également être introduit entre l'enzyme et la surface afin de réduire les interactions hydrophobes/hydrophiles ou ioniques défavorables, rendre le site actif plus accessible et modifier la mobilité de l'enzyme.

Dans le cas où l'enzyme est piégée à l'intérieur d'un matériau, il a été montré que, de manière générale, la réduction de la porosité du matériau améliore l'activité catalytique en diminuant la mobilité de la protéine et en augmentant son confinement (effet de concentration locale). Par contre, le transfert de masse à travers la matrice d'immobilisation diminue l'accessibilité des enzymes immobilisés aux substrats et peut affecter la cinétique de la réaction ainsi que le pH optimal et l'affinité apparente vis-à-vis du substrat¹⁹⁸.

Dans le cas où les protéines sont fixées à des particules, on observe une augmentation de l'efficacité catalytique avec la diminution de la taille des particules, ce qui peut être attribué à une augmentation de la fréquence des collisions entre le substrat et l'enzyme.

Références

1. Clark Jr, L.C. Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. *Trans. Am. Soc. Arti. Intern. Organs* **1956**, 2, 41-48.
2. Clark Jr, L.C.; Lyons, C., Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1962**, 102, 29-45.
3. Updike, S.J.; Hicks, G.P., The enzyme electrode. *Nature* **1967**, 214, 986-988.
4. Guilbault, G.G.; Montalvo Jr, J.G., Urea-specific enzyme electrode. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 2164-2165.
5. Diviès, C., Remarques sur l'oxydation de l'éthanol par une electrode microbienne d'*acetobacter zylinum*. *Ann. Microbiol.* **1975**, 126 A, 175-186.
6. Clemens, A.H.; Chang, P.H.; Myers, R.W., Development of an automatic system of insulin infusion controlled by blood sugar, its system for the determination of glucose and control algorithms. *Journ. Annu. Diabetol. Hôtel-Dieu*, **1976**, Mai, 269- 278.
7. Cass, A.E.G.; Davis, G.; Francis, G.D.; Allen, H.; Hill, O., Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Anal. Chem.* **1984**, 56, 667-671.
8. Liedberg, B.; Nylander, C.; Lunström, I., Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sens. Actuators, B* **1983**, 4, 299-304.
9. Schöning, M.J.; Schroth, P.; Schütz, S., The use of insect chemreceptors for the assembly of biosensors based on semiconductor field-effect transistors. *Electroanalysis* **2000**, 12, 645-652.
10. Kim, B.K.; Li, J.; Im, J.-E.; Ahn, K.-S.; Park, T. S.; Cho S. I.; Kim, Y.-R.; Lee, W.-Y., Impedometric estrogen biosensor based on estrogen receptor alpha-immobilized gold electrode. *J. Electroanal. Chem.* **2012**, 671, 106-111.
11. Du, L.; Wu, C.; Liu, Q.; Huang, L.; Wang, P., Recent advances in olfactory receptor-based biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, 42, 570-580.
12. Zeng, X.; Shen, Z.; Mernaugh, R., Recombinant antibodies and their use in biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 402, 3027-3038.
13. Ricci, F.; Adornetto, G.; Palleschi, G., A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. *Electrochim. Acta* **2012**, 84, 74-83.
14. Prodromidis, M.I., Impedimetric immunosensors - A review. *Electrochim. Acta* **2010**, 55, 4227-4233.

15. Conroy, P.J.; Hearty, S.; Leonard, P.; O’Kennedy, R.J., Antibody production, design and use for biosensor-based applications. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **2009**, 20, 10-26.
16. Tosar, J.P.; Branas, G.; Laíz, J., Electrochemical DNA hybridization sensors applied to real and complex biological samples. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, 26, 1205-1217.
17. Cagnin, S.; Caraballo, M.; Guiducci, C.; Martini, P; Ross, M.; SantaAna, M.; Danley, D.; West,T.; Lanfranchi, G., Overview of electrochemical DNA Biosensors: new approaches to detect the expression of life. *Sensors* **2009**, 9, 3122-3148.
18. Carrascosa, L.G.; Calle, A.; Lechuga, L.M., Label-free detect ion of DNA mutations by SPR: application to the early detection of inherited breast cancer. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 393, 1173-1182.
19. Ensafi, A.A.; Taei, M.; Rahmani, H.R.; Khayamian, T., Sensitive DNA impedance biosensor for detection of cancer, chronic lymphocytic leukemia, based on gold nanoparticles/gold modified electrode. *Electrochim. Acta* **2011**, 56, 8176-8183.
20. Tichoniuk, M.; Gwiazdowska, D.; Ligaj, M.; Filipiak, M. Electrochemical detection of foodborne pathogen *Aeromonas hydrophila* by DNA hybridization biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, 26, 1618-1623.
21. Walter, A.; Wu, J.; Flechsig, G.-U.; Haake, D.A.; Wang, J., Redox cycling amplified electrochemical detection of DNA hybridization: application to pathogen *E. coli* bacterial RNA. *Anal. Chim. Acta* **2011**, 689, 29-33.
22. Zhan, Q.; Dai, P.; Yang, Z., Sensitive DNA hybridization biosensors based on gold nanoparticles for testing DNA damage by Cd(II) ions. *Microchim Acta* **2011**, 173, 347-352.
23. Nowicka, A.M.; Kowalczyk, A.; Stojek, Z.; Hepel, M., Nanogravimetric and voltammetric DNA-hybridization biosensors for studies of DNA damage by common toxicants and pollutants. *Biophys. Chem.* **2010**, 146, 42-53.
24. Ensafi, A.A.; Rezaei, B.; Amini, M.; Heydari-Bafrooei, E., A novel sensitive DNA–biosensor for detection of a carcinogen, Sudan II, using electrochemically treated pencil graphite electrode by voltammetric methods. *Talanta* **2012**, 88, 244-251.
25. Carlo, M.D.; Di Marcello, M.; Perugini, M.; Ponzielli, V.; Sergi, M.; Mascini, M.; Compagnone, D., Electrochemical DNA biosensor for polycyclic aromatic hydrocarbon detection. *Microchim. Acta* **2008**, 163, 163-169.
26. Maciejewska, D.; Szpakowska, I.; Wolska, I.; Niemyjska, M.; Mascini, M.; Maj-Zurawska M., DNA-based electrochemical biosensors for monitoring of bis-indoles as potential antitumoral agents, chemistry, X-ray crystallography. *Bioelectrochemistry* **2006**, 69, 1-9.

27. Farukh, A. Mubashira, A.; Sartaj, T., Cyclic voltammetry-An electrochemical approach to study metal-based potential antitumor drug-DNA interaction. *Curr. Anal. Chem.* **2011**, 7, 71-79.
28. Campàs, M.; Carpentier, R.; Rouillon, R., Plant tissue-and photosynthesis-based biosensors. *Biotechnol. Adv.* **2008**, 26, 370-378.
29. Wu, F.; Huang, Y.; Huang, C., Chemiluminescence biosensor system for lactic acid using natural animal tissue as recognition element. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 21, 518-522.
30. McCarney, B.; Traynor, I.M.; Fodey, T.L.; Crooks, S.R.H.; Elliott, C.T., Surface plasmon resonance biosensor screening of poultry liver and eggs for nicarbazin residues. *Analytica Chimica Acta* **2003**, 483, 165-169.
31. Ravikumar, S.; Ganesh, I.; Yoo, I.-K.; Hong, S.H., Construction of a bacterial biosensor for zinc and copper and its application to the development of multifunctional heavy metal adsorption bacteria. *Process Biochem.* **2012**, 47, 758-765.
32. Su, L.; Jia, W.; Hou, C.; Lei, Y., Microbial biosensors: A review. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, 26, 1788-1799.
33. Lagarde, F.; Jaffrezic-Renault, N., Cell-based electrochemical biosensors for water quality assessment. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 400, 947-964.
34. Eltzov, E.; Marks, R.S., Whole-cell aquatic biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 400, 895-913.
35. Shin, H.J., Genetically engineered microbial biosensors for in situ monitoring of environmental pollution. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, 89, 867-877.
36. Campàs, M.; Prieto-Simón, B.; Marty, J.-L., A review of the use of genetically engineered enzymes in electrochemical biosensors. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **2009**, 20, 3-9.
37. Dyk, J.S.V., Pletschke, B. Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment. *Chemosphere* **2011**, 82, 291-307.
38. Ispas, C.R.; Crivat, G.; Andreescu, S., Review: Recent developments in enzyme-based biosensors for biomedical analysis. *Anal. Lett.* **2012**, 45, 168- 86.
39. Kotanen, C.N.; Moussy, F.G.; Carrara, S.; Guiseppi-Elie, A., Implantable enzyme amperometric biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, 35, 14-26.
40. Monosik, R.; Stredansky, M.; Tkac, J.; Sturdik, E., Application of enzyme biosensors in analysis of food and beverages. *Food Anal. Methods* **2012**, 5, 40-53.

41. Ramanathan, K.; Danielsson, B., Principles and applications of thermal biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, 16, 417-423.
42. Yakovleva, M.; Bhand, S.; Danielsson, B. The enzyme thermistor - A realistic biosensor concept. A critical review. *Anal. Chim. Acta* **2012**, 766, 1-12.
43. Vermeir, S.; Nicola, B. M.; Verboven, P.; Gerwen, P. V.; Baeten, B.; L Hoflack; Vulsteke, V.; Lammertyn, J., Microplate Differential Calorimetric Biosensor for Ascorbic Acid Analysis in Food and Pharmaceuticals. *Anal. Chem.* **2007**, 79, 6119-6127.
44. Ferreira, G.N.M.; Da-Silva, A.C.; Tome, B., Acoustic wave biosensors: physical models and biological applications of quartz crystal microbalance. *Trends Biotechnol.* **2009**, 27, 689-697.
45. Becker, B.; Cooper, M.A. A survey of the 2006–2009 quartz crystal microbalance biosensor literature. *J. Mol. Recognit.* **2011**, 24, 754-787.
46. O’Sullivan, C.K.; Guilbault, G.G., Commercial quartz crystal microbalances – theory and applications. *Biosens. Bioelectron.* **1999**, 14, 663-670.
47. Arora, P.; Sindhu, A.; Dilbaghi, N.; Chaudhury, A., Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, 28, 1-12.
48. Lubbers, D. W.; Opitz, N. Z., Die pCO₂/pO₂ optode : eine neue pCO₂,pO₂ messonde zur mesung der pCO₂ oder pO₂ von gasen und fussigkeiten. *Z. Naturforsch.* **1975**, 30C, 532 - 533.
49. Fan, X.; White, I.M.; Shopova, S. I.; Zhu, H.; Suter, J.D.; Sun Y., Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. *Anal. Chim. Acta* **2008**, 620, 8-26.
50. Velasco-Garcia, M.N., Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **2009**, 20, 27-33.
51. Wang, X.-D. Wolfbeis, O.S., Fiber-optic chemical sensors and biosensors (2008–2012). *Anal. Chem.* **2013**, 85, 487 - 508.
52. Bosch, M.E.; Sánchez, A.J.R.; Rojas, F.S.; Ojeda, C.B., Recent development in optical fiber biosensors *Sensors* **2007**, 7, 797-859.
53. Leung, A.; Shankar, P.M.; Mutharasan, R., A review of fiber-optic biosensors. *Sens. Actuators B* **2007**, 125, 688-703.
54. Nguyen-Ngoc, H.; Tran-Minh, C., Fluorescent biosensor using whole cells in an inorganic translucent matrix. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 583, 161-165.
55. Hong, J., Choi; J.S., Han G.; Kang, J.K.; Kim, C.-M.; Kim, T.S.; Yoon, D.S., A Mach-Zehnder interferometer based on silicon oxides for biosensor applications. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 573-574, 97-103.

56. Heideman, R.G.; Kooyman, R.P.H.; Greve, J., Performance of a highly sensitive optical waveguide Mach-Zehnder interferometer immunosensor. *Sens. Actuators, B* **1993**, 10, 209-217.
57. Duval, D.; González-Guerrero, A.B.; Dante, S.; Domínguez, C.; Lechuga, L.M., Interferometric waveguide biosensors based on Si-technology for point-of-care diagnostic. *Proc. SPIE 8431, Silicon Photonics and Photonic Integrated Circuits III*, **2012**, 84310P; doi:84310.81117/84312.922139.
58. Luff, B.J.; Wilkinson, J.S.; Piehler, J.; Hollenbach, U.; Ingenhoff, J.; Fabricius N. Integrated optical Mach-Zehnder biosensor. *J. Lightwave Technol.* **1998**, 16, 583-592.
59. Qi, Z.-M.; Matsuda, N.; Itoh, K.; Murabayashi, M.; Lavers, C.R., A design for improving the sensitivity of a Mach-Zehnder interferometer to chemical and biological measurands. *Sens. Actuators, B* **2002**, 81, 254-258.
60. Melnik, E.; Bruck, R.; Hainberger, R.; Lämmerhofer, M. Multi-step surface functionalization of polyimide based evanescent wavephotonic biosensors and application for DNA hybridization by Mach-Zehnder interferometer. *Anal. Chim. Acta* **2011**, 699, 206-215.
61. Hoa, X.D.; Kirk, A.G.; Tabrizian, M. Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: A review of recent progress. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 23, 151-160.
62. Li, M.; Li, R.; Li, C.M.; Wu, N., Electrochemical and optical biosensors based on nanomaterials and nanostructures: A Review. *Front. Biosci.* **2011**, 3, 1308-1331.
63. Bedford, E.E.; Spadavecchia, J.; Pradier, C.-M.; Gu, F.X., Surface plasmon resonance biosensors Incorporating Gold Nanoparticles. *Macromol. Biosci.* **2012**, 12, 724-739.
64. Sípová, H.; Homola, J., Surface plasmon resonance sensing of nucleic acids: A review. *Anal. Chim. Acta* **2013**, 773, 9-23.
65. Qureshi, A.; Gurbuz, Y.; Niazi, J.H., Biosensors for cardiac biomarkers detection: A review. *Sens. Actuators, B* **2012**, 171 - 172, 62-76.
66. Breault-Turcot, J.; Masson, J.-F., Nanostructured substrates for portable and miniature SPR biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 403, 1477-1484.
67. Wijaya, E. ; Lenaerts, C.; Maricot, S.; Hastanin, J.; Habraken, S.; Vilcot, J.-P.; Boukherroub, R.; Szunerits, S., Surface plasmon resonance-based biosensors: From the development of different SPR structures to novel surface functionalization strategies. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2011**, 15, 208-224.
68. Yanez-Sedeno, P.; Riu, J.; Pingarron, J.M.; Rius, F.X., Electrochemical sensing based on carbon nanotubes. *Trends Anal. Chem. TrAC* **2010**, 29, 939-953.

69. Ronkainen, N.J.; Halsall, H.B.; Heineman, W.R., Electrochemical biosensors. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1747-1763.
70. Grieshaber, D.; MacKenzie, R.; Vörös, J.; Reimhult, E., Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors* **2008**, 8, 1400-1458.
71. Bratov, A.; Abramova, N.; Ipatov, A., Recent trends in potentiometric sensor arrays — A review. *Anal. Chim. Acta* **2010**, 678, 149-159.
72. Gupta, V.K.; Nayak, A.; Agarwal, S.; Singhal, B., Recent advances on potentiometric membrane sensors for pharmaceutical analysis. *Comb. Chem. Hight. T. Scr.* **2011**, 14, 284-302.
73. Ghosh, G.; Bachas, L.G.; Anderson, K.W., Biosensor incorporating cell barrier architectures on ion selective electrodes for early screening of cancer. *Anal. Bioanal. Chem* **2008**, 391, 2783-2791.
74. Bergveld, P., Development of an ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurements. *IEEE Trans. Biomed. Eng* **1970**, 17, 70-71.
75. Shinwaria, M.W.; Deen, M.J.; Landheer, D., Study of the electrolyte-insulator-semiconductor field-effect transistor (EISFET) with applications in biosensor design. *Microelectron. Reliab.* **2007**, 47, 2025-2057.
76. Yuqing, M.; Jianguo, G.; Jianrong, C., Ion sensitive field effect transducer-based biosensors. *Biotechnol. Adv.* **2003**, 21, 527-534.
77. Bettaieb, F.; Ponsonnet, L.; Lejeune, P.; Ben Ouada, H.; Martelet, C.; Bakhrouf, A.; Jaffrézic-Renault, N.; Othmane A., Immobilization of E. coli bacteria in three-dimensional matrices for ISFET biosensor design. *Bioelectrochemistry* **2007**, 71, 118-125.
78. Vijayalakshmi, A.; Tarunashree, Y.; Baruwati, B.; Manorama S.V.; Narayana B.L.; Johnson R.E.; Rao N.M., Enzyme field effect transistor (ENFET) for estimation of triglycerides using magnetic nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, 23, 1708-1714.
79. Sasaki, Y.; Ogawa, J.; Tani, T., Simple and convenient measurement of enzyme reaction by high sensitive signal accumulation ISFET biosensor (AMIS Sensor) and Micro Bioactivity Analyzer. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2012**, 1, 259-261.
80. Lee, C.-S.; Kim, S.K.; Kim, M., Ion-Sensitive Field-Effect Transistor for Biological Sensing. *Sensors* **2009**, 9, 7111-7131.
81. Lin, T.-W.; Kekuda, D.; Chua, C.-W., Label-free detection of DNA using novel organic-based electrolyte-insulator-semiconductor. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, 25, 2706-2710.

82. Wang, J., Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, 19, 47-53.
83. Chaubey, A.; Malhotra, B.D., Review : Mediated biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, 17, 441-456.
84. Lee, J.A.; Hwang S.; Kwak, J.; Park, S. I.; Lee, S. S.; Lee, K.-C., An electrochemical impedance biosensor with aptamer-modified pyrolyzed carbon electrode for label-free protein detection. *Sens. Actuators B* **2008**, 129, 372-379.
85. Lötzbeier, T.; Schuhmann, W.; Schmidt, H.-L., Electron transfer principles in amperometric biosensors: direct electron transfer between enzymes and electrode surface. *Sens. Actuators B* **1996**, 33, 50-54.
86. Pejicic, B.; Marco, R.D., Impedance spectroscopy: Over 35 years of electrochemical sensor optimization. *Electrochim. Acta* **2006**, **51**, 6217-6229.
87. Bonanni, A.; Valle, M.D., Use of nanomaterials for impedimetric DNA sensors: A review. *Anal. Chim. Acta* **2010**, 678, 7-17.
88. Gáspár, S.; David, S.; Polonschii, C.; Marcu, I.; Gheorghiu, M.; Gheorghiu E., Simultaneous impedimetric and amperometric interrogation of renal cells exposed to a calculus-forming salt. *Anal. Chim. Acta* **2012**, 713, 115-120.
89. Jaffrezic-Renault, N.; Dzyadevych, S.V., Conductometric Microbiosensors for Environmental Monitoring. *Sensors* **2008**, 8, 2569-2588.
90. Coury, L., Conductance measurements - Part 1: theory. *Curr. Sep.* **1999**, 18, 91-96.
91. Bard, A.J.; Faulkner, L.R., *Electrochemical Methods : Fundamentals and Applications* - John Wiley & Sons, Inc Second Edition, **2001**, 65-66 .
92. Phuong, D.T.; Mai, A.T.; Tran, Q.H.; Le, A.-T.; Nguyen, V.H., Facile preparation of a DNA sensor for rapid herpes virus detection. *Mater. Sci. Eng., C* **2010**, 30, 1145-1150.
93. Hnaïen, M.; Hassen, W.M.; Abdelghani, A.; Fournier-Wirth, C.; Coste, J.; Bessueille, F.; Leonard, D.; Jaffrezic-Renault N., A conductometric immunosensor based on functionalized magnetite nanoparticles for *E. coli* detection. *Electrochem. Commun.* **2008**, 10, 1152-1154.
94. Liu, H.; Yang, Y.; Chen, P.; Zhong, Z., Enhanced conductometric immunoassay for hepatitis B surface antigen using double-codified nanogold particles as labels. *Biochem. Eng. J.* **2009**, 45, 107-112.
95. Zhang, S.; Wright, G.; Yang, Y. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. *Biosens. Bioelectron.* **2000**, 15, 273-282.

96. Hierlemann, A.; Brand, O.; Hagleitner, C.; Baltes H., Microfabrication Techniques for Chemical/Biosensors. *Proc. IEEE* **2003**, 91, 839-863.
97. Zhou, Y.; Zhia , J., The application of boron-doped diamond electrodes in amperometric biosensors. *Talanta* **2009**, 79,1189-1196.
98. Windmiller, J. R.; Wang, J., Wearable Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review. *Electroanalysis* **2013**, 25, 29-46.
99. Spegel, C.; Heiskanen, A.; Skjolding, L.H.D.; Emneus J., Chip based electroanalytical systems for cell analysis. *Electroanalysis* **2008**, 20, 680-702.
100. Tudorache M.; Bala C., Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 388, 565-578.
101. Alonso-Lomillo, M.A.; Domínguez-Renedo, O;Arcos-Martínez, M.J., Screen-printed biosensors in microbiology; a review. *Talanta* **2010**, 82, 1629-1636.
102. Varshney, M.; Li, Y., Interdigitated array microelectrodes based impedance biosensors for detection of bacterial cells. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, 24, 2951-2960.
103. Min, J.; Baeumner, A.J., Characterization and optimization of interdigitated ultramicroelectrode arrays as electrochemical biosensor transducers. *Electroanalysis* **2004**, 16, 724-729.
104. Gerwen, P.V.; Laureyn, W.; Laureys, W.; Huyberechts, G.; De Beeck, M. O.; Baert, K.; Suls, J.; Sansen, W.; Jacobs, P.; Hermans, L.; Mertens R., Nanoscaled interdigitated electrode arrays for biochemical sensors. *Sens. Actuators B* **1998**, 49, 73-80.
105. Xue, Q.; Bian, C.; Tong J.; Sun, J.; Zhang, H.; Xia S., Fabrication of a 3D interdigitated double-coil microelectrode chip by MEMS technique. *Microchim. Acta* **2012**, 177, 491-496.
106. Kuphala, M.; Mills, C.A.; Korri-Youssoufi, H.; Samitier, J., Polymer-based technology platform for robust electrochemical sensing using gold microelectrodes. *Sens. Actuators B* **2012**, 161, 279-284.
107. Slaughter, G. A., Gold Interdigitated Microelectrodes Fabricated on Polyhydroxybutyrate Substrate for the Determination of Urea Using Impedimetric Measurements, *IEEE Sensors J.*, **2012**, 12, 821-826.
108. Shim, J.S.; Rust, M. J.; Ahn, C.H., A large area nano-gap interdigitated electrode array on a polymer substrate as a disposable nano-biosensor. *J. Micromech. Microeng.*, **2013**, 23, 6pp.
109. Huey, E.; Krishnan, S.; Arya S. K.; Dey, A., Bhansali, S., Optimized growth and integration of silica nanowires into interdigitated microelectrode structures for biosensing *Sens. Actuators B*, **2012**, 175, 29-33.

110. Wermuth, C.G.; Ganellin, C.R.; Linberg, P.; Mitscher, L.A., Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). *Pure Appl. Chem.* **1998**, 70, 1129-1143.
111. Pelmont, J. *Enzyme : Catalyseurs du monde vivant*, Presses Universitaires de Grenoble, Grenoble **1995**, 112.
112. Chen, L.H.; Kenyon, G. L.; Curtin, F.; Harayama, S.; Bembenek, M.E.; Gholamhossein, T.; Hajipour, T.; Whitman, C.P., 4-oxalocrotonate tautomerase, an enzyme composed of 62 amino acid residues per monomer. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 17716-17721.
113. Smith, S., The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB J.* **1994**, 8, 1248-1259.
114. Holme, D.J.; Peck, H., *Anal. Biochem* 3è édition, **1998**.
115. Tanaka, N.; Kusakabe, Y.; Ito, K.; Yoshimoto, T.; Nakamura, K.T., Crystal structure of formaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida*: the structural origin of the tightly bound cofactor in nicotinoprotein dehydrogenases. *J. Mol. Biol.* **2002**, 324, 519-533.
116. Casanova-Schmitz, M.; David, R.M.; Heck, H.D.A., Oxidation of formaldehyde and acetaldehyde by NAD⁺-dependent dehydrogenase in rat nasal mucosal homogenates. *Biochem. Pharmacol.* **1984**, 33, 1137-1142.
117. Ogushi, S.; Ando, M.; Tsuru, D., Substrate specificity of formaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. *Agr. Biol. Chem.* **1984**, 48, 597-601.
118. Sanghani, P.C.; Stone, C. L.; Ray, B.D.; Pindel, E.V.; Hurley, T.D.; Bosron W.F., Kinetic mechanism of human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* **2000**, 39, 10720-10729.
119. Kato, N.; Omori, Y.; Tani, Y.; Ogata, K., Alcohol oxidases of *Kloeckera sp.* and *Hansenula polymorpha* catalytic properties and subunit structures. *Eur. J. Biochem.* **1976**, 64, 341-350.
120. Gregg, J.M.; Madden, K.R.; Barringer, K.J.; Thill, G.P.; Stillman, C.A., Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* **1989**, 9, 1316-1323.
121. Tani, Y.; Sakai, Y.; Yamada, H., Isolation and characterization of a mutant of a methanol yeast, *Candida boidinii* S2, with higher formaldehyde productivity. *Agr. Biol. Chem.* **1985**, 49, 2699-2706.
122. Harris, T.K.; Davidson, V.L., Thermal stability of methanol dehydrogenase is altered by the replacement of enzyme-bound Ca²⁺ with Sr²⁺. *Biochem. J.* **1994**, 303, 141-145.

123. Habermüller, K.; Mosbach, M.; Schuhmann, W., Review: Electron transfer mechanisms in amperometric biosensors. *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, 366, 560-568.
124. Kondo, T.; Morikawa, Y.; Hayashi, N., Purification and characterization of alcohol oxidase from *Paecilomyces variotii* isolated as a formaldehyde-resistant fungus. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, 77, 995-1002.
125. Couderc, R.; Baratti, J., Oxidation of methanol by the yeast, *Pichia pastoris*. Purification and properties of the alcohol oxidase. *Agr. Biol. Chem.* **1980**, 44, 2279-2289.
126. Azevedo, A.M.; Cabral, J.M.S.; Prazeres, D.M.F.; Gibson, T.D.; Fonseca, L.P., Thermal and operational stabilities of *Hansenula polymorpha* alcohol oxidase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, 27, 37-45.
127. Maeda-Yorita, K.; Aki, K.; Sagai, H.; Misaki, H.; Massey, V., L-Lactate oxidase and L-lactate monooxygenase: Mechanistic variations on a common structural theme. *Biochimie* **1995**, 77, 631-642.
128. Li, S.J.; Umena Y.; Yorita, K.; Matsuoka, T.; Kita, A.; Fukui, K.; Morimoto Y., Crystallographic study on the interaction of L-lactate oxidase with pyruvate at 1.9 Å resolution. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, 358, 1002-1007.
129. Sullivan, P.A.; Soon, C.Y.; Schreurs, W.J.; Cutfield, J.F.; Shepherd, M.G., The structure of L-lactate oxidase from *Mycobacterium smegmatis*. *Biochem. J.* **1977**, 165, 375-383.
130. Duncan, J.D.; Wallis, J.O.; Azari, M.R., Purification and properties of *Aerococcus viridans* lactate oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, 164, 919-926.
131. Eisenberg, A.; Seip, J. E.; Gavagan, J. E.; Payne, M. S.; Anton, D. L.; DiCosimo, R., Pyruvic acid production using methylotrophic yeast transformants as catalyst. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1997**, 2, 223-232.
132. Umena, Y.; Yorita, K.; Matsuoka, T.; Kita, A.; Fukui, K.; Morimoto, Y., The crystal structure of L-lactate oxidase from *Aerococcus viridans* at 2.1 Å resolution reveals the mechanism of strict substrate recognition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 350, 249-256.
133. Tolbert, N.E.; Clagett, C.O.; Burris, R.H., Products of the oxidation of glycolic acid and L-lactic acid by enzymes from tobacco leaves. *J. Biol. Chem.* **1949**, 181, 905-914.
134. Sullivan, P.A., Crystallization and properties of L-lactate oxidase from *Mycobacterium smegmatis*. *Biochem. J.* **1968**, 110, 363-371.
135. Lockridge, O.; Massey, V.; Sullivan, P.A., Mechanism of action of the flavoenzyme lactate oxidase. *J. Biol. Chem.* **1972**, 247, 8097-8106.

136. Walsh, C.; Lockridge, O.; Massey, V.; Abeless, R., Studies on the mechanism of action of the flavoenzyme lactate oxidase. Oxidation and elimination with beta-chlorolactate. *J. Biol. Chem.* **1973**, 248, 7049-7054.
137. Müh, U.; Williams Jr, C.H.; Masse, V., Lactate monooxygenase. Additive contributions of active site residues to catalytic efficiency and stabilization of an anionic transition state. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 7994-8000.
138. Rodriguez-Lopez, J. N.; Lowe, D. J.; Hernandez-Ruiz, J.; Hiner, A. N. P.; Garcia-Canovas, F.; Thorneley, R. N. F., Mechanism of reaction of hydrogen peroxide with horseradish peroxidase: identification of intermediates in the catalytic cycle. *J. Amer. Chem. Soc.* **2001**, 123, 11838-11847.
139. Veitch, N.C., Molecules of interest - Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* **2004**, 65, 249-259.
140. Fujiyama, K. J.; Takemura, H.; Shibayama, S.; Kobayashi, K.; Takano, M.; Yamada, Y.; Okada, H., Structure of the horseradish peroxidase isozyme C genes. *Eur. J. Biochem.* **1988**, 173, 681-687.
141. Hernandez-Ruiz, J.; Arnao, M.B.; Hiner, A.N.P.; Garcia-Canovas, F.; Acosta, M., Catalase-like activity of horseradish peroxidase: relationship to enzyme inactivation by H₂O₂. *Biochem. J.* **2001**, 354, 107-114.
142. Amine, A.; Mohammadi, H.; Bourais, I.; Palleschi, G., Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, 21, 1405-1423.
143. Kucherenko, I.S.; Soldatkin, O.O.; Arkhypova, V.M.; Dzyadevych, S.V.; Soldatkin, A.P., A novel biosensor method for surfactant determination based on acetylcholinesterase inhibition. *Meas. Sci. Technol.* **2012**, 23, 65801-65807.
144. Lei, Y.; Chen, W.; Mulchandani, A. Review : microbial biosensors. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 568, 200-210.
145. Rogers, K.R., Recent advances in biosensor techniques for environmental monitoring. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 568, 222-231.
146. Marques, P.R.B.d.O.; Nunes, G.S.; Santos, T.C.R.; Andreescu, S.; Marty, J.-L., Comparative investigation between acetylcholinesterase obtained from commercial sources and genetically modified *Drosophila melanogaster*. Application in amperometric biosensors for methamidophos pesticide detection. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, 20, 825-832.

147. Lin, Y.; Lu, F.; Wang, J. , Disposable Carbon Nanotube Modified Screen-Printed Biosensor for Amperometric Detection of Organophosphorus Pesticides and Nerve Agents. *Electroanalysis* **2004**, 16, 145-149.
148. Tsai, H.C.; Doong, R.A.; Chiang, K.T.; Chen, K.T., Sol-gel derived urease-based optical biosensor for the rapid determination of heavy metals. *Anal. Chim. Acta* **2003**, 481, 75-84.
149. Sassolas, A.; Blum, L.J.; Leca-Bouvier, B.D., Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol. Adv.* **2012**, 30, 489 - 511.
150. Zheng, Y.-H.; Hua, T.-C.; Sun, D.-W.; Xiao, J.-J.; Xu, F.; Wang, F.-F., Detection of dichlorvos residue by flow injection calorimetric biosensor based on immobilized chicken liver esterase. *J. Food Eng.* **2006**, 74, 24 - 29.
151. Cao, M.; Li, Z.; Wang, J.; Ge, W.; Yue, T.; Li, R.; Colvin, V. L.; Yu, W. W., Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification, and food analysis. *Trends. Food. Sci. Tech.* **2012**, 27, 47 - 56.
152. Nanduri, V.; Sorokulova, I. B.; Samoylov, A. M.; Simonian, A. L.; Petrenko, V. A.; Vodyanoy, V., Phage as a molecular recognition element in biosensors immobilized by physical adsorption.. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 986 - 992.
153. Datta, S.; Christena, L.R.; Rajaram, Y.R.S., Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotech.* **2013**, 3, 1-9.
154. Iyer, P.V.; Ananthanarayan, L., Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process. Biochem.* **2008**, 43, 1019 - 1032.
155. Shimomura, T.; Itoh, T.; Sumiya, T.; Mizukami, F.; Ono, M., Amperometric determination of choline with enzyme immobilized in a hybrid mesoporous membrane. *Talanta* 2009, 78, 217 - 220.
156. Resnick, P.R., A short history of Nafion. *L'actualité chimique* **2006**, 301-302, 144 - 147.
157. Mauritz, K.A.; Moore, R.B., State of understanding of Nafion. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 4535 - 4585.
158. Jorn, R.; Savage, J.; Voth G.A., Proton conduction in exchange membranes across multiple length scales. *Accounts Chem. Res.* **2012**, 45, 2002–2010.
159. Chia, C.-H.; Wu, Z.; Wu, C.-H.; Cheng, R.-H.; Ding, S., Resolve the pore structure and dynamics of Nafion 117: application of high resolution ⁷Li solid state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mater. Chem.*, **2012**, 22, 22440–22445.
160. Wang, B.; Dong, S., Sol-gel derived amperometric biosensor for hydrogen peroxide based on methylene green incorporated in Nafion film. *Talanta* **2000**, 51, 565 - 572.

161. Tseng, T.-F.; Yang, Y.-L.; Chuang, M.-C.; Lou, S.-L.; Galik, M.; Flechsig, G.-U.; Wang, J., Thermally stable improved first-generation glucose biosensors based on Nafion/glucose-oxidase modified heated electrodes. *Electrochem. Commun.* **2009**, 11, 1819 - 1822.
162. Litescu, S.C.; Eremia, S.A.V.; Bertoli, A.; Pistelli, L.; Radu, G.-L., Laccase-Nafion based biosensor for the determination of polyphenolic secondary metabolites. *Anal. Lett.* **2010**, 43, 1089 - 1099.
163. Norouzi, P.; Faridbod, F.; Larijani, B.; Ganjali, M.R., Glucose biosensor based on MWCNTs-gold nanoparticles in a Nafion film on the glassy carbon electrode using flow injection FFT continuous cyclic voltammetry. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2010**, 5, 1213 - 1224.
164. Ren, J.; Shi, W. Li, K.; Ma, Z., Ultrasensitive platinum nanocubes enhanced amperometric glucose biosensor based on chitosan and nafion film. *Sens. Actuators B* **2012**, 163, 115 - 120.
165. Lu, J.; Drzal, L.T.; Worden, R.M.; Lee, I., Simple fabrication of a highly sensitive glucose biosensor using enzymes immobilized in exfoliated graphite nanoplatelets Nafion membrane. *Chem. Mater.* **2007**, 19, 6240 - 6246.
166. ElKaoutit, M.; Naranjo-Rodriguez, I.; Dominguez, M.; Hernandez-Artiga, M. P.; Bellido-Milla, D.; Cisneros, J. L. H.-H, A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on Horseradish Peroxidase (HRP) enzyme immobilized in a Nafion-sonogel-carbon composite. *Electrochim. Acta* **2008**, 53, 7131 - 7137.
167. Moore, C.M.; Akers, N.L.; Hill, A.D.; Johnson, Z.C.; Minteer, S.D., Improving the environment for immobilized dehydrogenase enzymes by modifying Nafion with tetraalkylammonium bromides. *Biomacromolecules* **2004**, 5, 1241 - 1247.
168. Migneault, I.; Dartiguenave, C.; Bertrand, M.J.; Waldron, K.C., Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques* **2004**, 37, 790 - 802.
169. Bowers, L.D., Application of immobilized biocatalysts in chemical analysis. *Anal. Chem.* **1986**, 58, 523 - 530.
170. Walt, D.R.; Agayn, V.I., The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. *Trends Anal. Chem.* **1994**, 10, 425 - 430.
171. Wu, F.; Huang, Y.; Li, Q., Animal tissue-based chemiluminescence sensing of uric acid. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 536, 107 - 113.
172. Chowdhury, A.D.; Dea, A.; Chaudhuri, C.R.; Bandyopadhyay, K.; Sen, P., Label free polyaniline based impedimetric biosensor for detection of *E.coli* O157:H7 bacteria. *Sens. Actuators B* **2012**, 171 - 172, 916 - 923.

173. Tao, L., Zhang, K., Sun, Y., Jin, B., Zhang, Z., Yang, K. Anti-epithelial cell adhesion molecule monoclonal antibody conjugated fluorescent nanoparticle biosensor for sensitive detection of colon cancer cells. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, 35, 186 - 192.
174. Fillit, C.; Jaffrezic-Renault, N.; Bessueille, F.; Leonard, D.; Mitsubayashi, K.; Tardy, J., Development of a microconductometric biosniffer for detection of trimethylamine. *Mater. Sci. Eng., C* **2008**, 28, 781 - 786.
175. Singh, J.; Mittal, S.K., *Chlorella* sp. based biosensor for selective determination of mercury in presence of silver ions. *Sens. Actuators B* **2012**, 165, 48 - 52.
176. Li, Y.-G.; Zhou, Y.-X.; Feng, J.-L.; Jiang, Z.-H.; Ma, L.-R., Immobilization of enzyme on screen-printed electrode by exposure to glutaraldehyde vapour for the construction of amperometric acetylcholinesterase electrodes. *Anal. Chim. Acta* **1999**, 382, 277 - 282.
177. Chang, K.-S.; Chang, C.-K.; Chou, S.-F.; Han, H.-C.; Chen, C.-Y., Characterization of a planar l-glutamate amperometric biosensor immobilized with a photo-crosslinkable polymer membrane. *Sens. Actuators B* **2007**, 122, 195 - 203.
178. Vo-Dinh, T.; Cullum, B.M.; Stokes, D.L., Nanosensors and biochips: frontiers in biomolecular diagnostics. *Sens. Actuators B* **2001**, 74, 2 - 11.
179. Wei, D.; Bailey, M. J. A.; Andrew, P.; Ryhänen, T., Electrochemical biosensors at the nanoscale. *Lab Chip* **2009**, 9, 2123–2131.
180. Kimmel, D.W.; LeBlanc, G.; Meschievitz, M.E.; Cliffel, D.E., Electrochemical sensors and biosensors. *Anal. Chem.* **2012**, 84, 685–707.
181. Zhang, X.; Guo, Q.; Cui, D., Recent Advances in Nanotechnology Applied to Biosensors. *Sensors* **2009**, 9, 1033-1053.
182. Pividori, M. I.; Alegret, S., Micro and nanoparticles in biosensing systems for food safety and environmental monitoring. An example of converging technologies. *Microchim. Acta* **2010**, 170, 227–242.
183. Willner, I.; Willner, B., Biomolecule-based nanomaterials and nanostructures. *Nano Lett.* **2010**, 10, 3805–3815.
184. Zeng, S.; Yong, K.-T.; Roy, I.; Dinh, X.-Q.; Yu, X.; Luan, F., A review on functionalized gold nanoparticles for biosensing applications. *Plasmonics* **2011**, 6, 491 - 506.
185. Kerman, K.; Saito, M.; Yamamura, S.; Takamura, Y.; Tamiya, E., Nanomaterial-based electrochemical biosensors for medical applications. *Trends Anal. Chem.* **2008**, 27, 585-592.
186. Pingarron, J. M.; Yanez-Sedeno, P.; Gonzalez-Cortes A., Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Electrochim. Acta* **2008**, 53, 5848–5866.

187. Ahammad, A. J. S.; Lee, J.-J.; Rahman, Md. A., Electrochemical sensors based on carbon nanotubes. *Sensors* **2009**, 9, 2289-2319.
188. Guo, S.; Dong, S., Biomolecule-nanoparticle hybrids for electrochemical biosensors. *Trends Anal. Chem.* **2009**, 28, 96-109.
189. Li, H.; Liu, S.; Dai, Z.; Bao, J.; Yang, X., Applications of nanomaterials in electrochemical enzyme biosensors. *Sensors* **2009**, 9, 8547-8561.
190. Ansari, S.A.; Husain, Q., Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnol. Adv.* **2012**, 30, 512 - 523.
191. Ryu, S.-W.; Kim, C.-H.; Han, J.-W.; Kim, C.-J.; Jung, C.; Park, H. G.; Choi, Y.-K., Gold nanoparticle embedded silicon nanowire biosensor for applications of label-free DNA detection. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, 25, 2182 -2185.
192. Wang, J.; Wang, L.; Sun, Y.; Zhu, X.; Cao, Y.; Wang, X.; Zhang, H.; Song, D., Surface plasmon resonance biosensor based on Au nanoparticle in titania sol-gel membrane. *Colloids Surf. B* **2010**, 75, 520 - 525.
193. Baby, T. T.; Ramaprabhu, S., SiO₂ coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticle dispersed multiwalled carbon nanotubes based amperometric glucose biosensor. *Talanta* **2010**, 80, 2016 - 2022.
194. Franzoi, A.C; Vieira, I.C.; Dupont, J.; Scheeren, C.W.; Oliveira, L.F.D., Biosensor for luteolin based on silver or gold nanoparticles in ionic liquid and laccase immobilized in chitosan modified with cyanuric chloride. *Analyst* **2009**, 134, 2320 - 2328.
195. Zapp, E.; Brondani, D.; Vieira, I. C.; Scheeren, C. W.; Dupont, J.; Barbosa, A. M. J.; Ferreira, V. S., Biomonitoring of methomyl pesticide by laccase inhibition on sensor containing platinum nanoparticles in ionic liquid phase supported in montmorillonite. *Sens. Actuators B* **2011**, 155, 331 - 339.
196. Talbert, J.N.; Goddard, J.M., Enzymes on material surfaces. *Colloids Surf, B* **2012**, 93, 8 - 19.
197. Fernandez-Lafuente, R., Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. *Enz. Microb. Technol.* **2009**, 45, 405 - 418.
198. Sheldon, R.A., Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, 92, 467 - 477.
199. Bolivar, J.M.; Rocha-Martin, J.; Mateo, C.; Cava, F.; Berenguer, J.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M., Coating of soluble and immobilised enzymes with ionic polymers: full stabilization of the quaternary structure of multimeric enzymes. *Biomacromolecules* **2009**, 10, 742-747

CHAPITRE II

II.1 Introduction

Le biocapteur faisant l'objet de ce premier chapitre vise à la détermination des alcools aliphatiques à chaîne courte. Des travaux antérieurs menés au laboratoire (thèse de M. Hnaïen) avaient déjà montré la faisabilité de détection du méthanol et de l'éthanol par un biocapteur bi-enzymatique conductimétrique utilisant l'alcool oxydase et la catalase immobilisées dans un gel d'alcool polyvinylique (PVA) réticulé¹. Cependant, tous les paramètres influençant la réponse du biocapteur n'avaient pas été optimisés. Par ailleurs, nous avons pu constater à plusieurs reprises par la suite un manque de reproductibilité des réponses du biocapteur ainsi que des problèmes de décrochage de la membrane de PVA non observés lors de la première étude. Il nous a donc paru intéressant de repartir de ce système existant afin de mieux comprendre son fonctionnement et d'améliorer sa robustesse. Nous avons choisi d'immobiliser les enzymes par réticulation à l'aide de vapeurs de glutaraldéhyde, méthode d'immobilisation commune à tous les capteurs développés dans cette thèse, et de remplacer la catalase par la peroxydase de raifort (HRP), enzyme plus robuste et plus active ayant la même fonctionnalité que la catalase dans le biocapteur, à savoir éliminer le peroxyde d'hydrogène formé par la réaction d'oxydation des alcools (chapitre I). Différents types de transducteurs ont par ailleurs été évalués.

II.1.1 Généralités sur le méthanol et l'éthanol

Les principales caractéristiques physico-chimiques de l'éthanol et du méthanol figurent dans le tableau II.1. Ce sont tous les deux, dans les conditions normales de température et de pression, des liquides incolores, volatiles et très inflammables. L'odeur dégagée par ces deux substances, lorsqu'elles sont pures, est plutôt agréable. Elle peut être perçue dès 84 ppm pour l'éthanol². Dans les milieux aqueux, la présence du groupement hydroxyle capable de former des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau les rend plus visqueux et moins volatiles que les autres solvants organiques ayant la même masse moléculaire.

Les deux alcools sont des composés chimiquement stables pouvant notamment intervenir comme réactifs dans des réactions d'oxydation, de déshydrogénation, de déshydratation et d'estérification, le méthanol étant plus réactif que l'éthanol.

Chapitre II : Optimisation d'un biocapteur enzymatique pour la détection conductimétrique des alcools aliphatiques à chaîne courte – Vers une meilleure compréhension des paramètres clefs influant les performances du biocapteur



Nom	Méthanol	Ethanol
Masse molaire	32,04 g.mol ⁻¹	46,07 g.mol ⁻¹
Point de fusion	-97,8°C	-114°C
Point d'ébullition	64,7°C	78-78,5°C
Densité	0,7915	0,789
Densité de vapeur (air = 1)	1,11	1,59
Température d'auto-inflammation	464°C	423-425°C
Solubilité	miscible dans l'eau	miscible dans l'eau et dans les solvants polaires ou apolaires
Précautions		

Tableau.II.1: Caractéristiques physico-chimiques du méthanol et de l'éthanol

Avec 50 milliards de tonnes produites chaque année (source : Journal de la France agricole), l'éthanol est incontestablement l'alcool le plus utilisé dans le monde. Sa production par fermentation est connue et réalisée depuis la civilisation babylonienne (3000 ans avant JC). Ce processus anaérobie, catalysé par des enzymes, transforme en alcool le sucre présent dans certains aliments tels que les fruits (raisin notamment) ou certaines plantes (Eq.II.1).



Le méthanol, quant à lui, est produit à hauteur de 50 millions de tonnes par an. Méthanol et éthanol peuvent être préparés par synthèse chimique. A l'échelle industrielle, l'éthanol est produit par catalyse acide à partir de l'éthylène (Eq.II.2) tandis que le méthanol est obtenu par hydrogénation sélective du monoxyde de carbone à haute pression (200 à 1000 bar) et température (300 à 450°C) (Eq.II.3) :



L'éthanol est omniprésent dans notre vie quotidienne, non seulement dans les boissons alcoolisées, mais également dans les produits cosmétiques et pharmaceutiques. L'alcool « à 90° » est un agent bactéricide et désinfectant. Depuis quelques années, l'éthanol est également présent dans le

biocarburant, l'E85, dont la source d'éthanol est issue de la culture de la canne à sucre, du blé et du maïs. L'éthanol, comme le méthanol, sont utilisés comme matières premières pour les synthèses de composés organiques, essentiellement celle de l'acide acétique, de l'acétate d'éthyle ou du formaldéhyde, ou encore celles d'additifs pour l'essence tels que l'éthyltertiobutylether, ajouté pour empêcher l'évaporation et l'humidité, ou le méthyltertiobutylether, utilisé comme antidétonant. (Fig.II.1.a et b)³.

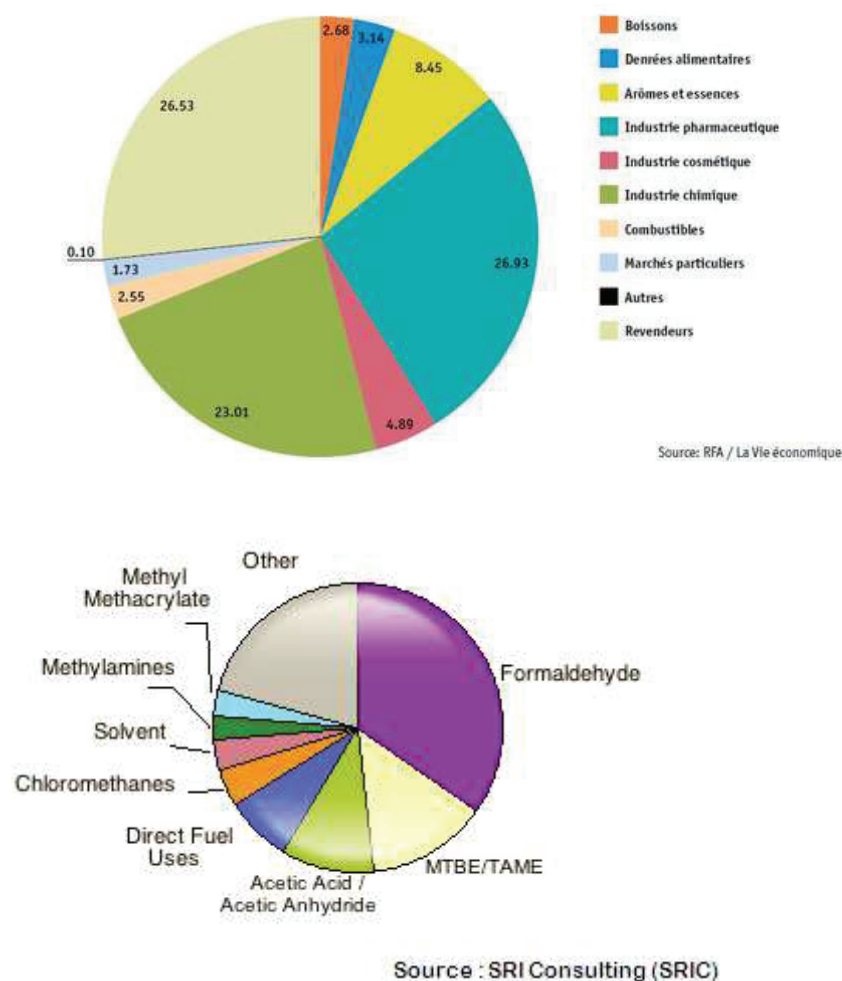


Fig.II.1: Consommation mondiale d'éthanol (%) par segment de marché en 2011 (a) et répartition des différentes utilisations mondiales du méthanol en 2009 (b)

II.1.2 Métabolisme et toxicité

II.1.2.1 Méthanol

Chez les mammifères, le méthanol peut être absorbé par ingestion, inhalation ou par voie cutanée³. Il est ensuite rapidement diffusé vers les organes, notamment le foie où se passe l'essentiel

du processus de métabolisation (Fig.II.2). Le méthanol est tout d'abord converti en formaldéhyde, cette réaction étant catalysée par l'alcool déshydrogénase (ADH), puis ce dernier est transformé en formiate grâce à la formaldéhyde déshydrogénase (FDH). Le cofacteur NAD^+ des deux déshydrogénases est régénéré via le métabolisme du pyruvate. Le métabolisme se termine par la formation de dioxyde de carbone sous la dépendance de l'acide folique⁴, étape limitante car non catalysée. Ceci explique l'accumulation dans l'organisme de méthanol non transformé et de formiate (plus toxique que le méthanol) lorsqu'une quantité importante de cet alcool pénètre dans l'organisme⁵. Des acidoses sanguines sont alors généralement observées⁴.

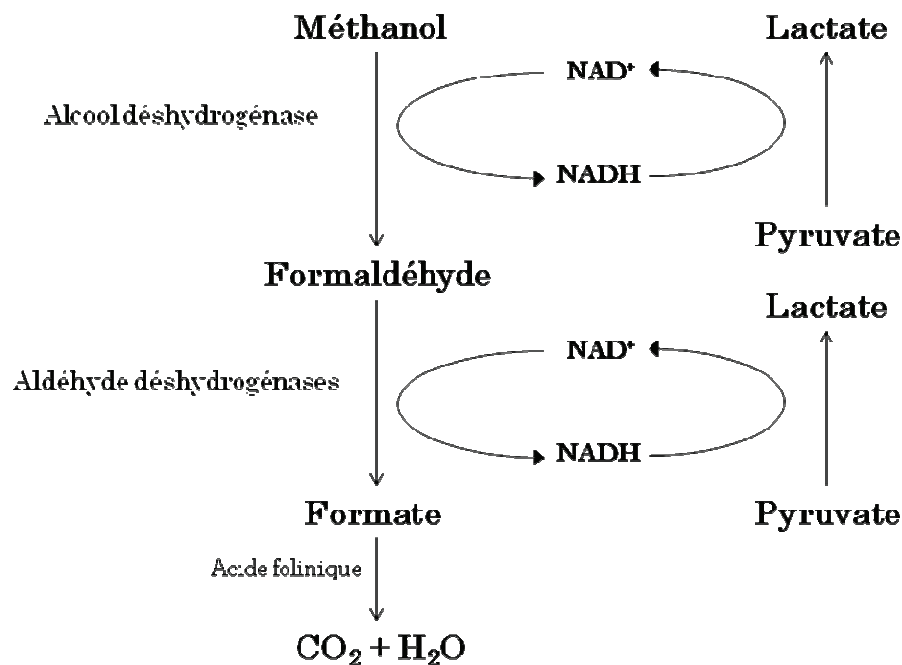


Fig.II.2: Métabolisme du méthanol⁴

Les symptômes de l'intoxication aiguë au méthanol concernent principalement le système nerveux central et se traduisent par une somnolence suivie par une phase d'excitation, un manque de coordination des mouvements volontaires, la paralysie, les troubles respiratoires, la cécité et même la mort dans les cas d'intoxication importante. La dose létale estimée pour les adultes est d'environ 15 mL d'une solution de méthanol à 40 %⁶. L'intoxication au méthanol peut être traitée par une dialyse ou l'administration d'éthanol⁶. Toutefois les séquelles oculaires sont très fréquentes⁵. L'exposition chronique au méthanol à des concentrations de 200 à 300 ppm peut entraîner des maux de tête persistants et répétés. Des teneurs plus élevées (entre 1200 à 1800 ppm) ont des conséquences graves sur les organes optiques⁵.

II.1.2.2 Ethanol

L'éthanol pénètre rapidement dans l'organisme par voie orale et par inhalation alors que l'absorption par voie cutanée est très faible (environ 1 %). Comme le méthanol, l'éthanol diffuse très rapidement et uniformément dans les organes, et traverse librement le placenta des femmes enceintes.

Le métabolisme de l'éthanol est proche de celui du méthanol, conduisant en 3 étapes à la formation d'acétaldéhyde, d'acétate et de dioxyde de carbone (Fig.II.3). La première étape se déroule en grande partie dans le foie et implique l'alcool déshydrogénase l'ADH et son coenzyme NAD^+ . A ce stade, les systèmes de catalase-peroxydase et de cytochrome P450 participent également. La deuxième étape, qui a lieu aussi majoritairement dans le foie (90 %) et minoritairement dans le rein (10 %), mène à la formation d'acétate grâce à l'enzyme aldéhyde déshydrogénase (ALDH) ² qui possède une activité très supérieure à celle de l'alcool déshydrogénase. Ainsi, l'accumulation d'acétaldéhyde n'est généralement pas observable. La dernière étape du métabolisme se termine dans les tissus périphériques par l'oxydation de l'acide acétique libéré dans le sang en CO_2 et en eau.

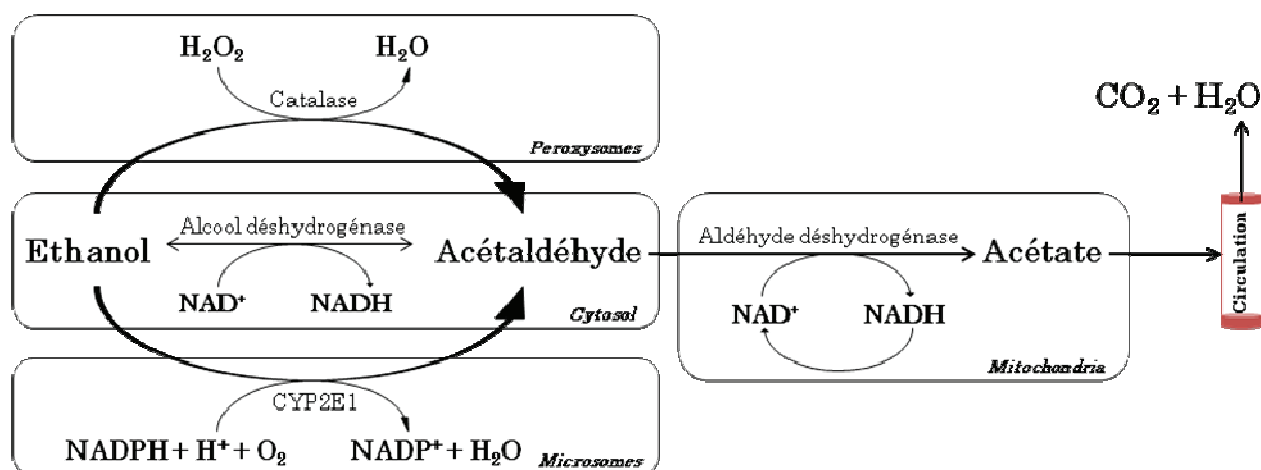


Fig.II.3: Métabolisme de l'éthanol

L'éthanol n'est pas considéré comme un produit toxique pour les êtres humains, contrairement au méthanol. La toxicité aiguë de l'éthanol est faible par inhalation et ingestion, et négligeable par contact avec la peau. Il provoque néanmoins quelques effets, principalement sur le système nerveux, avec une première phase d'excitation suivie d'une dépression. Avec 0,2 g/L d'éthanol dans le sang, le temps de réaction et la coordination motrice diminuent. En France, l'alcoolémie est considérée comme la première cause d'accidents de la route, en particulier chez les jeunes (40 % en 2010). Le code de la route mentionne qu'il est interdit de conduire quand le taux d'alcool atteint 0,5 g/L dans le sang, - 97 -

soit 2,5 mg/L d'air expiré (Article R234-1). Les solutions contenant plus de 70 % d'éthanol peuvent provoquer des dommages gastriques sévères. L'exposition à 1400 ppm de vapeur d'éthanol pendant 30 minutes peut entraîner des maux de tête et un léger engourdissement. Les effets causés par l'éthanol sont relativement transitoires et disparaissent après la fin de l'exposition. Dans les cas d'expositions répétées, une tolérance peut apparaître. Cependant, une consommation régulière d'éthanol par ingestion provoque des séquelles d'ordre neuropsychique (trouble de mémoire), digestifs (pancréatite), cardio-vasculaires ou hématologiques.

De plus, depuis 2007, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a classé l'éthanol dans le groupe 1 des agents cancérigènes. Une absorption régulière de liquides alcoolisés accroît le risque de certains cancers, particulièrement celui de l'appareil digestif, du foie, du sein ou celui du cancer colorectal. Des effets néfastes de l'éthanol sur la fertilité masculine, les cycles menstruels féminins et le développement du fœtus ont également été observés.

II.1.3 Biocapteurs enzymatiques pour la détection des alcools

En raison de leur importance dans la société et de leurs effets toxiques, le méthanol et l'éthanol constituent des analytes cibles d'intérêt majeur. Un grand nombre de techniques analytiques sont actuellement disponibles pour la détermination de l'éthanol et d'autres alcools aliphatiques à chaînes courtes comme le méthanol. Il s'agit essentiellement de méthodes chimiques (titrages d'oxydo-réduction ou colorimétriques), de techniques spectroscopiques (infra-rouge, UV-Visible, fluorescence) ou chromatographiques (chromatographie en phase gazeuse ou en phase liquide)^{3, 7, 8}. Les plus performantes d'entre elles nécessitent des opérateurs qualifiés et l'utilisation d'instruments coûteux, pour certains difficilement utilisables sur le terrain⁷. Ces inconvénients peuvent être surmontés grâce à l'utilisation de biocapteurs.

De nombreux biocapteurs à base de cellules entières⁹⁻¹¹ ou d'enzymes ont été proposés pour l'analyse des alcools. Ils exploitent le pouvoir catalytique de différentes enzymes telles que l'alcool déshydrogénase (ADH)¹²⁻¹⁵, l'alcool oxydase (AOX)^{8, 16-20} ou la méthanol déshydrogénase (MDH)³, les deux premières étant les plus employées car bien caractérisées et commerciales. La MDH qui catalyse essentiellement la réaction d'oxydation du méthanol en formaldéhyde²¹, n'est pas disponible commercialement mais peut être extraite à partir de bactéries méthylotrophes strictes ou facultatives.

L'ADH, particulièrement celle extraite de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (EC 1.1.1.1) qui est commerciale, a fait l'objet de nombreuses études de caractérisation. Il s'agit d'une enzyme

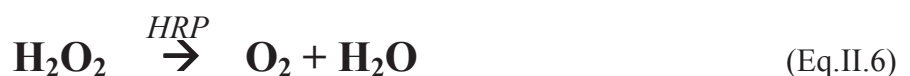
appartenant à la famille des oxydoréductases qui catalysent préférentiellement les réactions d'oxydation des alcools primaires aliphatiques^{22, 23} en présence du cofacteur NAD^+ (Eq.II.4). La présence de ce cofacteur représente une contrainte majeure pour l'élaboration des biocapteurs à base d'ADH. L'addition du cofacteur libre NAD^+ en quantité suffisante pour bien assurer les fonctions catalytiques de l'enzyme entraîne un surcoût^{19, 20}. De plus, le cofacteur doit pouvoir approcher suffisamment près de l'enzyme^{7, 19} ce qui pourrait compliquer l'étape d'immobilisation de l'enzyme. Il existe également des ADHs (pyrroloquinoline quinone)-dépendantes²⁴ mais elles ne sont pas non plus commercialisées et stables. Il serait donc nécessaire de mettre en œuvre les bactéries contenant ces enzymes, ce qui alourdirait le système.



La dernière enzyme, l'AOX (EC 1.1.3.13), appartient également à la famille des oxydoréductases. Cependant, elle possède naturellement au sein de sa structure son coenzyme, le FAD. En présence de l'oxygène dissous, cette enzyme catalyse l'oxydation des alcools en aldéhyde (Eq.II.5).



La stabilité de l'AOX est légèrement plus faible que celle de l'ADH^{18, 19}, mais peut être améliorée grâce au choix d'un mode d'immobilisation adapté¹⁹ tel que l'emprisonnement dans une membrane polymérique^{16, 17, 20, 25-27}, la réticulation par le glutaraldéhyde^{18, 19, 28}, l'addition de stabilisant au sein de la biomembrane¹⁷ ou l'utilisation de nouveaux nanomatériaux^{20, 28, 29}. Dans la mesure du possible, l'utilisation d'une grande quantité d'enzyme permet également de créer un réservoir suffisant en cas d'inactivation partielle¹⁶. Enfin, une deuxième enzyme de la famille des peroxydases, comme la HRP ou la catalase, peut être ajoutée afin de réduire les effets inhibiteurs du peroxyde d'hydrogène produit par l'oxydation de l'alcool, et de régénérer l'oxygène (Eq.II.6) nécessaire à la réaction catalysée par l'AOX (Eq.II.5).



II.2 Matériels et méthodes

II.2.1 Réactifs

Toutes les solutions aqueuses ont été préparées avec de l'eau ultra-pure (résistivité > 18 MΩ.cm) obtenue à partir d'un système de purification Simplicity (Millipore). L'AOX (EC 1.1.3.13) extraite d'*Hansenula polymorpha* (solide, 1,65 U.mg⁻¹ solide, 5 U.mg⁻¹ prot), de *Candida boidinii* (solide, 1,16 U.mg⁻¹, 10,27 U.mg⁻¹ prot), ou de *Pichia pastori* (solution de saccharose à 30 % en milieu tampon phosphate, 32 U.mg⁻¹ prot), la HRP (EC1.11.1.9, 188 U.mg⁻¹ solide), l'albumine de sérum bovin (BSA), le glutaraldéhyde (GA) (grade II, 25 % solution aqueuse), l'hydrate de flavine adénine dinucléotide disodique (> 95 %), KH₂PO₄ (> 99 %) K₂HPO₄ (98 %), le formaldéhyde (37 % en poids dans H₂O, contient du méthanol en tant que stabilisant 10-15 %), le n-butanol (>98 %), le n-propanol (99,7 %), le 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS, > 98 %), la solution de nanoparticules d'or (20 nm, contenant 0,01 % HAuCl₄) et le tétrachloroaurate (III) dihydrate de sodium (NaAuCl₄.2H₂O, solide > 99 %) ont été achetés chez Sigma Aldrich. L'éthanol (99,7 %) et le méthanol (99,8 %) provenaient de Carlo Erba. Le glycérol (> 99 %) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, 30 %) provenaient respectivement d'Acros Organics et de Fluka. Les solutions mères des alcools (méthanol ou éthanol) ainsi que des substances testées lors de l'étude des interférences ont été préparées dans du tampon phosphate 5 mM pH 7 et conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation. Les mélanges AOX/BSA/glycérol ainsi que celui de BSA/glycérol ont été conservés à -20°C entre deux utilisations, tandis que le mélange HRP/BSA/glycérol a été gardé à 4°C.

II.2.2 Détermination de l'activité des différentes alcool oxydases

La détermination de l'activité des AOXs a été réalisée en suivant les instructions du fournisseur des enzymes (Sigma Aldrich). Toutes les solutions nécessaires (tampon phosphate, ABTS, méthanol et solutions enzymatiques diluées) ont été fraîchement préparées le jour des mesures. Celles-ci ont été effectuées à une longueur d'onde de 405 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible modèle UV 1605 de Shimadzu et à une température de 25°C fixée à l'aide d'un bain thermostaté. Le zéro de l'appareil a été réglé sur le tampon.

Le principe de la mesure se base sur une succession de deux réactions enzymatiques présentées ci-après, impliquant l'alcool oxydase et la peroxydase de raifort.



Un témoin sans alcool oxydase est réalisé. Pour les mesures d'activité, un mélange de 2,8 mL d'ABTS à 2 mM et 0,01 mL d'une solution de HRP à 250 U.mL⁻¹ est incubé pendant 5 minutes dans un bain thermostaté à 25°C. Lorsque le signal est stable, une première lecture de l'absorbance à 405 nm est effectuée. La deuxième est réalisée après addition de 0,01 mL de H₂O₂ 0,003 % (w/w) et de 0,1 mL de tampon dans le cas des mesures du blanc et d'AOX dans le cas des mesures d'activité. Une deuxième stabilisation est nécessaire avant l'ajout de 0,1 mL de MeOH 1 % (v/v). L'ensemble est immédiatement mélangé et l'augmentation de l'absorbance à 405 nm est enregistrée pendant 6 minutes.

L'activité enzymatique est ensuite déterminée par la formule suivante :

$$\text{Unité/mL d'enzyme} = \frac{(\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min Test} - \Delta A_{405\text{nm}}/\text{min Blanc})(3,01)(d_f)}{(36,8)(0,1)} \quad (\text{Eq.II.9})$$

avec : 3,01: volume total de dosage (mL); d_f : facteur de dilution ; 36,8 : coefficient d'extinction millimolaire d'ABTS à 405 nm ; 0,10 : volume d'enzyme utilisée (mL)

II.2.3 Transducteurs

Trois types de transducteurs interdigités de surfaces sensibles et de géométries différentes ont été comparés dans cette étude :

- des capteurs commercialisés par la société BVT Technologies (République Tchèque). Il s'agit de deux paires d'électrodes en alliage Pt/Au sérigraphiées sur céramique (corindon) (Fig.II.4.a). Les contacts situés à l'extrémité des électrodes sont en or et sont reliés à la zone sensible par des lignes conductrices recouvertes d'une couche de protection diélectrique. Chaque paire d'électrodes est munie de 5 doigts, la surface de la zone sensible est d'environ 9 mm², la longueur des doigts de 3 mm et la distance interdigitale de 400 μm,
- des électrodes interdigitées en or (épaisseur: 150 nm) fabriquées à l'Institut de Physique des Semi-conducteurs Lashkaryov (IPSL, Kiev, Ukraine) par dépôt sous vide sur substrat

céramique (5×30 mm). Une couche intermédiaire de chrome de 50 nm d'épaisseur a été utilisée pour améliorer l'adhérence de la couche d'or. La largeur de chaque doigt ainsi que l'espace interdigital sont de $20\ \mu\text{m}$ et la longueur des doigts est d'environ 1 mm. Chaque paire d'électrodes compte 40 doigts et sa surface sensible est d'environ $1\ \text{mm}^2$ (Fig.II.4.b).

- des microélectrodes fabriquées sur substrat de silicium au Centro Nacional de Microelectronica (CNM, Barcelone) en utilisant un processus photolithographique en quatre étapes. Les électrodes sont recouvertes d'une couche de nitrure de silicium de 400 nm d'épaisseur sauf au niveau de la zone sensible et des connexions. Les doigts (longueur : environ 0,15 mm, nombre : 60) sont reliés par des lignes de Pt conductrices. La distance interdigitale et la largeur des doigts est de $20\ \mu\text{m}$ et la surface active est d'environ $0,372\ \text{mm}^2$ (Fig.II.4.c). Contrairement aux deux autres types de transducteurs, les deux électrodes nécessaires aux mesures en mode différentiel (référence et travail) sont totalement indépendantes.

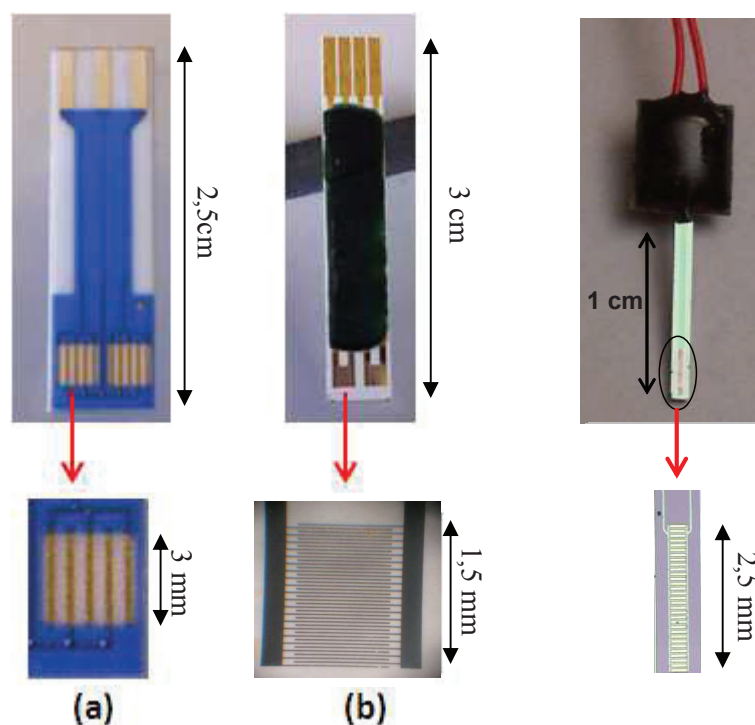


Fig.II.4 : Présentation des trois types de transducteurs interdigités utilisés dans ce travail.

(a) : BVTT, (b) : IPSL, (c) : CNM

II.2.4 Préparation des biocapteurs

Avant utilisation, les capteurs sont nettoyés avec de l'eau ultra-pure puis de l'éthanol. Les lignes d'or conductrices des transducteurs IPSL sont recouvertes manuellement avec du vernis acrylique BlocJelt (ITW Spraytec, Asnières sur Seine, France) pour les isoler. Après cela, $0,3\ \mu\text{L}$ d'une solution

de tampon phosphate 20 mM pH 7 contenant 5 % (m/v) de BSA, 10 % (m/v) de glycérol et 15 % (m/v) poudre d'HRP sont déposés sur la paire d'électrodes de travail, tandis que 0,3 μ L d'un mélange contenant 20 % (m/v) de BSA et 10 % (m/v) de glycérol sont déposés sur les électrodes de référence. Dans le cas où des nanoparticules d'or ont été utilisées, les premières couches des électrodes de référence et de travail sont remplacées par 0,3 μ L de la solution commerciale de nanoparticules. Le capteur est laissé sécher pendant 20 min à température ambiante. Puis, une deuxième couche est déposée sur chaque électrode, suivant le même protocole, sauf que la HRP est remplacée par l'AOX dans la solution enzymatique (Fig.II.5). Il est à signaler que les pourcentages donnés pour les teneurs en enzymes dans les solutions correspondent à des pourcentages en masse de solide et non en masse de protéine. Après dépôt des solutions d'enzymes et de BSA, le capteur est placé dans une atmosphère saturée en vapeurs de glutaraldéhyde pendant 30 min. Les membranes sont ensuite séchées à température ambiante pendant 1 h. Après préparation, les biocapteurs sont gardés à sec à 4°C puis reconditionnés dans du tampon phosphate 5 mM pendant au moins 30 min avant la première mesure. Ils sont par ailleurs conservés à 4°C dans du tampon phosphate 20 mM pH 7 entre deux jours de mesure.

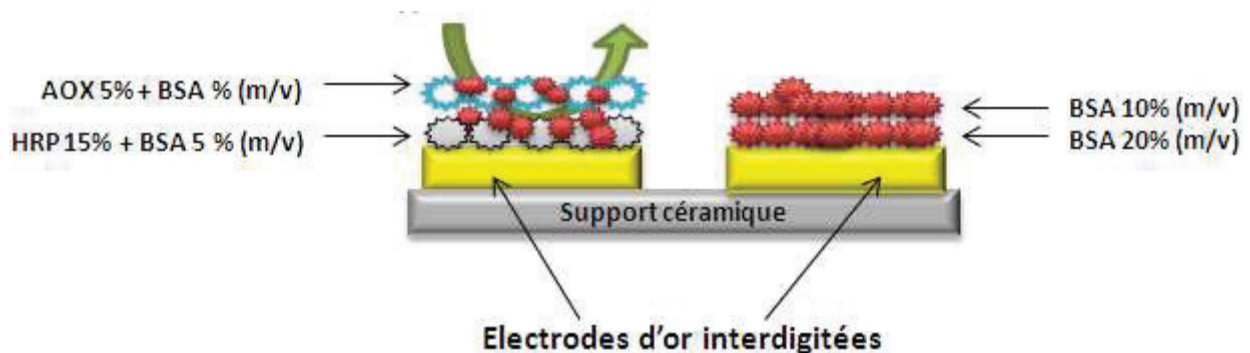


Fig.II.5 : Constitution du biocapteur bienzymatique AOX/HRP

II.2.5 Mesures conductimétriques

Les capteurs sont placés dans un bécher rempli de 5 mL de tampon phosphate 5 mM pH 7 sous agitation magnétique. Une tension alternative (amplitude : 10 mV, fréquence : 100 kHz) générée par un générateur d'onde à basse fréquence (amplificateur SR830 Lock-in de Stanford Research Systems) est appliquée aux paires différentielles d'électrodes et la différence de conductance ΔG est mesurée entre la paire d'électrodes de référence et celle de travail (Fig.II.6). Les valeurs d'amplitude et de fréquence choisies permettent de limiter les processus faradiques, la charge de la double couche, la polarisation des microélectrodes et d'obtenir la proportionnalité entre le potentiel de sortie U_{out} et ΔG .

Une fois la stabilisation obtenue, des petits volumes (5-120 μ l) de solutions concentrées

contenant MeOH ou EtOH et les substances interférentes sont ajoutés dans le récipient. La réponse du biocapteur, correspondant à l'évolution de ΔG après addition des substrats, est enregistrée en fonction de différents paramètres (méthode d'immobilisation, temps de réticulation, quantité d'enzyme ...). Les mesures sont effectuées à 23 ± 2 ° C.

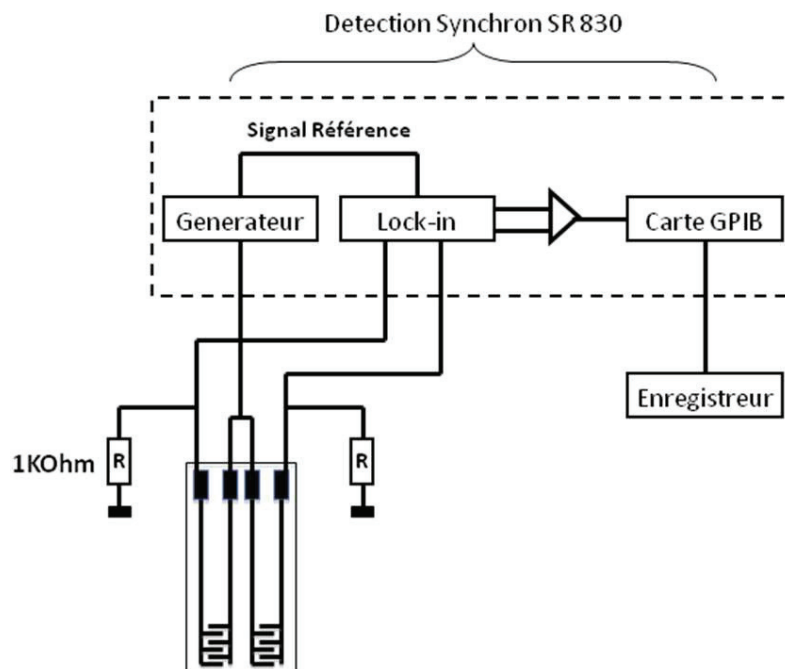


Fig.II.6: Schéma du montage utilisé pour la mesure conductimétrique

II.3. Résultats et discussion

II.3.1 Choix du transducteur

Dans le développement d'un biocapteur, le choix du transducteur est très important puisqu'il va affecter sa sensibilité et va orienter le choix du mode d'immobilisation le plus approprié compte tenu du biorécepteur choisi. Dans ce travail, nous avons évalué les performances de trois transducteurs. Il s'agit dans tous les cas de paires d'électrodes en or interdigitées, individuelles ou assemblées par deux sur un même substrat. Dans ce dernier cas, une paire va servir de référence et la deuxième de travail. Les transducteurs diffèrent par le substrat sur lequel l'or a été déposé, ainsi que par leur taille et leur géométrie. Ainsi deux d'entre elles (de l'IPSL et de BVTT) sont assemblées par deux sur un substrat en céramique (Fig.II.4 a et b), tandis que la troisième (du CNM) ne comporte qu'une paire d'électrodes sur un substrat en silicium (Fig.II.4 c). La zone sensible des capteurs de BVTT est environ 10 fois plus grande que celles des capteurs de l'IPSL (9 mm^2 au lieu de 1 mm^2) et 30 fois plus que les capteurs du CNM ($0,372 \text{ mm}^2$). Les distances interdigitales des capteurs de l'IPSL et du CNM sont par

ailleurs identiques (20 μm), tandis que cette distance est 20 fois plus grande pour les capteurs de BVTT.

II.3.1.1 Evaluation de la réponse des capteurs nus

Nous avons tout d'abord comparé la sensibilité des trois transducteurs en mesurant pour chacun d'entre eux, et pour chacune des paires d'électrodes, la variation de conductance du milieu après ajout de concentrations croissantes en KCl dans un tampon phosphate 5 mM pH 7 servant d'électrolyte de fond. Une tension alternative de 10 mV d'amplitude et de 100 kHz de fréquence a été appliquée dans tous les cas. Par contre, il a été nécessaire d'ajouter une résistance de 100 kohms dans le circuit pour les mesures avec les électrodes du CNM, tandis qu'une résistance de 1 kohm suffit pour celles de l'IPSL et de BVTT (Fig.II.6).

Ainsi que le montre la figure suivante (Fig.II.7), les trois électrodes répondent linéairement avec la concentration en KCl jusqu'à 0,6 M, puis la réponse tend vers un palier de saturation. Cependant, la réponse obtenue avec le capteur de l'IPSL est nettement plus élevée que celle obtenue avec les autres transducteurs. La valeur du bruit de fond est également la plus faible (0,59 μS comparée à 0,92 μS pour le capteur du CNM et 1,15 μS pour celui de BVTT). Le capteur du CNM, qui possède le même espace interdigital et la même largeur de doigt que le capteur IPSL, présente une sensibilité (pente de la droite de régression calculée dans le domaine 0-0,6 M) six fois plus faible, en adéquation avec la réduction de la longueur des doigts (environ 0,15 au lieu de 1 mm). La valeur de conductance mesurée à la saturation est par ailleurs 3 fois plus faible, en accord avec la diminution de la surface totale de la surface active (0,372 au lieu de 1 mm^2). Ces résultats sont cohérents avec la théorie et les données de la littérature présentées dans le §I.2.2. Les sensibilités et valeurs à la saturation les plus faibles, respectivement 8 et 6 fois plus faibles que celles mesurées pour les capteurs de l'IPSL, sont obtenues pour les transducteurs de BVTT qui possèdent le plus petit nombre de doigts et surtout la plus grande distance interdigitale (0,4 mm).

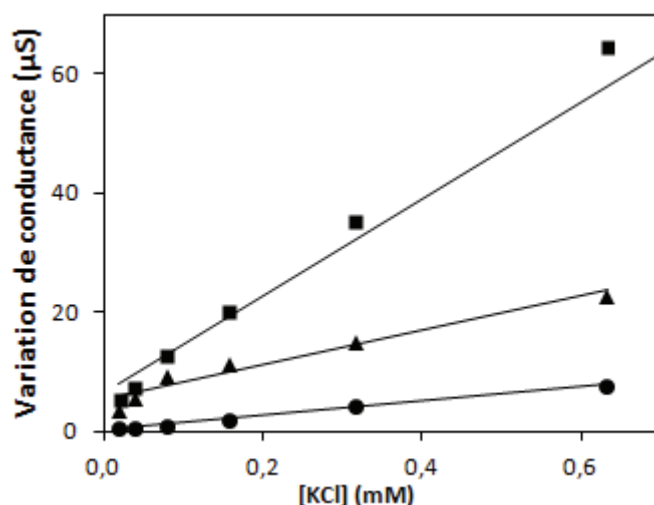


Fig.II.7 : Comparaison des trois types de transducteurs : (▲) :CNM ; (■) : IPSL et (●) : BVTT. Mesures en mode non différentiel dans le tampon phosphate 5 mM pH. Potentiel appliqué: 10 mV – Fréquence : 100 kHz.

II.3.1.2. Tests en présence d'enzyme

Des tests en présence d'enzymes ont ensuite été réalisés sur les trois types de transducteurs. De l'AOX a été immobilisée par réticulation à l'aide de vapeurs de glutaraldéhyde (30 min), comme décrit dans la partie expérimentale. Après une nuit à sec à 4°C et un reconditionnement dans du tampon phosphate 5 mM pH 7 (tampon de mesure), nous avons constaté un détachement de la membrane enzymatique, pourtant bien réticulée, de la surface des transducteurs du CNM (Fig.II.8). Par contre, la membrane reste bien accrochée aux transducteurs de l'IPSL ou de BVTT. Ce résultat peut être attribué à la différence de substrat, la céramique semblant favoriser l'adhérence des enzymes avant réticulation.



Fig.II.8 : Détachement des biomembranes contenant les deux enzymes AOX d'*H. polymorpha* et HRP après reconditionnement dans le tampon phosphate

Compte tenu de la grande surface sensible des électrodes de BVTT, nous avons essayé de compenser leur faible sensibilité intrinsèque en augmentant le volume de solution enzymatique déposé sur le transducteur. Nous avons testé des volumes de 0,6 ; 0,8 et 1,2 µL. L'intensité augmente avec le

volume déposé pour atteindre celle obtenue avec les capteurs de l'IPSL pour 1,2 μ L. Le temps de réticulation doit néanmoins être augmenté en parallèle à l'accroissement de volume afin d'assurer une bonne étape de réticulation, ce qui a pour conséquence de multiplier par trois le bruit de fond. Le rapport signal sur bruit est donc plus faible que celui que nous avons obtenu pour les capteurs de l'IPSL. Ces derniers ont finalement été retenus pour la suite de notre étude.

II.3.2 Choix de la souche de provenance de l'alcool oxydase

Il existe trois enzymes commerciales de type alcool oxydase provenant de trois souches de levures : *Hansenula polymorpha*, *Candida boidinii* et *Pichia pastoris*. Les valeurs de K_M données dans la fiche fournie par Sigma Aldrich pour l'éthanol, le méthanol, le n-propanol, le n-butanol et le formaldéhyde figurent dans le tableau II.2. On constate que les affinités de l'AOX issue de *Pichia pastoris* vis-à-vis de l'éthanol et du méthanol sont très proches, alors que dans le cas de l'AOX d'*Hansenula polymorpha*, le méthanol apparaît comme un substrat d'affinité nettement plus forte que l'éthanol.

Enzymes	K_M méthanol (mM)	K_M éthanol (mM)	K_M n-propanol (mM)	K_M n-butanol (mM)	K_M formaldéhyde (mM)
<i>Pichia pastoris</i>	1,4	1			
<i>Hansenula polymorpha</i>	2,15	16,2	66	166	2,6
<i>Candida boidinii</i>	3	-			

Tableau.II.2: Comparaison des valeurs de K_M des trois alcool oxydases commercialisées par Sigma Aldrich

II.3.2.1 Mesure de l'activité enzymatique des trois enzymes libres

Les activités des lots d'enzymes utilisés dans cette étude ont été mesurées par spectrophotométrie en suivant la procédure donnée par leur fournisseur (Sigma-Aldrich). On constate tout d'abord que les activités mesurées sont nettement inférieures à celles déclarées, ce que l'on peut attribuer à de mauvaises conditions de transport des enzymes. En effet, celles-ci doivent être conservées à -20°C et se trouvaient à température ambiante à leur arrivée au laboratoire. Les cycles de congélation/décongélation peuvent être néfastes à l'activité des AOXs, qui sont bien connues pour leur faible stabilité. L'ordre des activités *Pichia pastoris* > *Candida boidinii* > *Hansenula polymorpha* est néanmoins respecté.

<i>Souche</i>	<i>Activité déclarée (U/mg protéine)*</i>	<i>Activité mesurée (U/mg protéine)*</i>
<i>Pichia pastoris</i>	32	14
<i>Hansenula polymorpha</i>	5	1,0
<i>Candida boidinii</i>	10,27	3,3

* 1 unité (U) oxyde 1 μmol de méthanol en formaldéhyde/min à pH 7,5 à 25°C

Tableau.II.3: Comparaison entre l'activité enzymatique déclarée et celle mesurée pour trois alcools oxydases commerciales

II.3.2.2 Mesure des activités catalytiques et des affinités pour le méthanol des enzymes immobilisées sur la surface sensible du transducteur

Les différentes enzymes ont ensuite été mélangées avec la BSA et le glycérol, comme indiqué dans la partie expérimentale, et immobilisées sur les transducteurs par réticulation pendant 30 min dans des vapeurs de glutaraldéhyde. La réponse conductimétrique des trois biocapteurs a été ensuite mesurée pour une concentration de 1 mM de méthanol. Comme le montre la figure II.9, l'injection de méthanol dans la cellule de mesure entraîne une augmentation rapide de la conductivité locale due à l'oxydation enzymatique de l'alcool. Un plateau est atteint lorsque la production d'ions à l'intérieur de la biomembrane s'équilibre avec le milieu extérieur. Cet équilibre est obtenu au bout d'1 min environ à cette concentration.

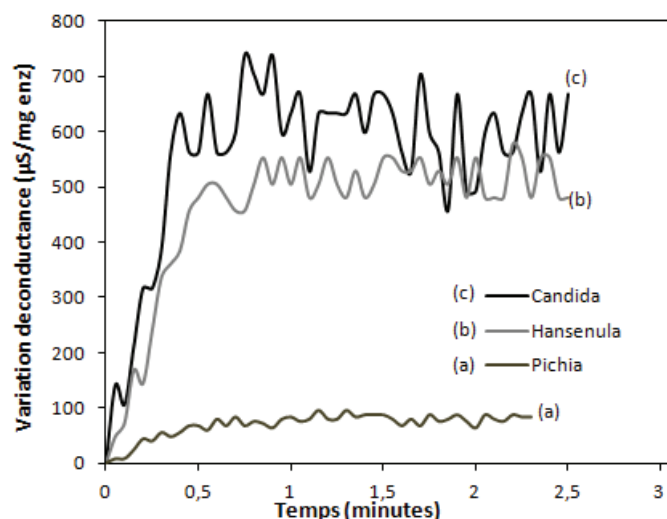


Fig.II.9 : Comparaison des réponses des biocapteurs conductimétriques préparés avec différentes alcools oxydases. $[\text{MeOH}] = 1 \text{ mM}$ dans du tampon phosphate 5 mM pH 7

La variation de conductance mesurée au cours des 20 premières secondes de réponse évolue de manière linéaire avec le temps, permettant de calculer une pente V_{Gi} que nous supposons être

proportionnelle à la vitesse initiale de la réaction enzymatique V_i , donc à l'activité. Les valeurs de V_{Gi} et de la variation de conductance ΔG mesurée à l'équilibre sont respectivement représentées pour chacune des souches sur les figures II.10 et II.11.

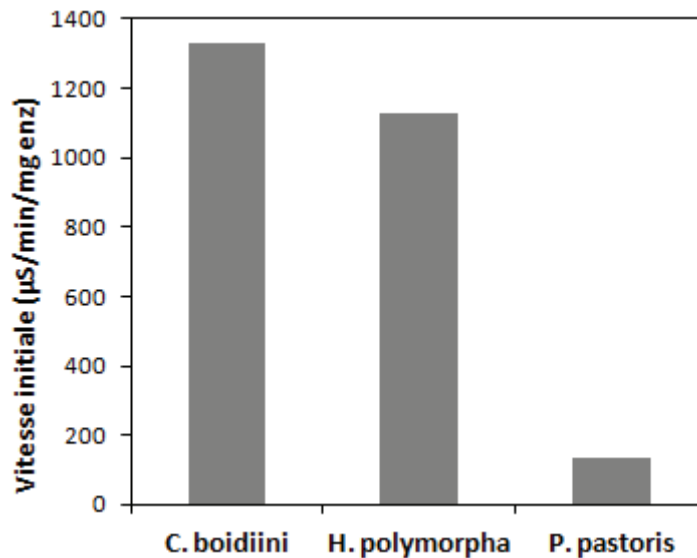


Fig.II.10 : Comparaison des valeurs de la vitesse initiale des biocapteurs conductimétriques préparés avec différentes alcools oxydases. [MeOH] = 1 mM dans du tampon phosphate 5 mM pH 7

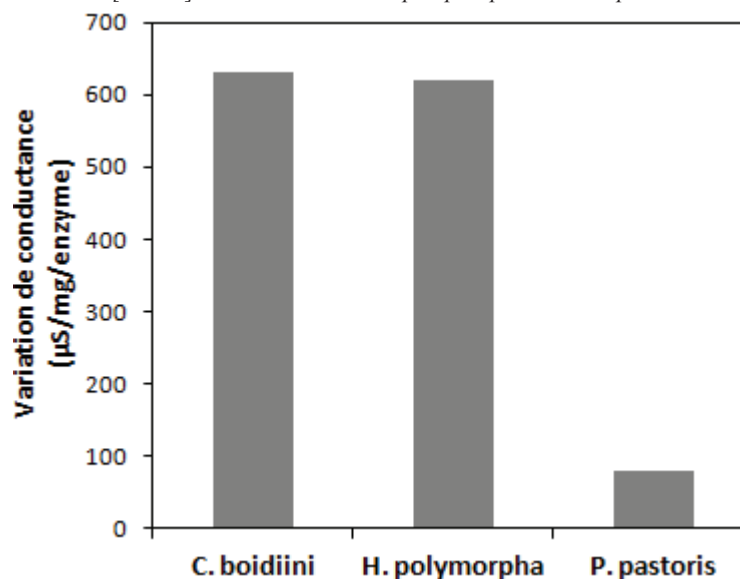


Fig.II.11 : Comparaison des valeurs de la variation de conductance mesurée à l'équilibre des biocapteurs conductimétriques préparés avec différentes alcools oxydases. [MeOH] = 1 mM dans du tampon phosphate 5 mM pH 7

Ainsi que le montre la figure II.10, la vitesse initiale obtenue pour l'AOX de *C. Boidiini* immobilisée sur le transducteur est légèrement supérieure à celle mesurée pour l'AOX d'*H. polymorpha*, en assez bon accord avec les valeurs d'activité mesurées pour les enzymes libres (Tab.II.3). Les valeurs de ΔG sont également très proches. Par contre, l'AOX issue de la souche *P. pastori* conduit à des réponses beaucoup plus faibles, que ce soit en terme de vitesse que de variation

de conductance. Ce résultat peut provenir du fait que l'AOX de *Pichia* est la seule à être commercialisée en solution (30 % de sucrose tamponné par du phosphate 100 mM, pH 8). Cette solution doit être directement mélangée au glycérol et à la BSA lors de la préparation de la membrane enzymatique, procédé qui ne convient peut-être pas à l'enzyme et provoque son inactivation. Ces résultats sont en accord avec ceux de Patel et al¹⁶ et de Costa Rama et al⁸ et nous avons donc décidé d'écarter l'AOX de *P. pastoris*. Pour des raisons de coût, l'AOX de *H. polymorpha* a finalement été retenue pour la suite du travail.

II.3.3. Stabilité des solutions enzymatiques

Nous avons ensuite évalué la stabilité de l'enzyme en solution dans du tampon 20 mM phosphate pH 7 contenant 5 % (m/v) de BSA et 10 % (m/v) de glycérol (solution déposée sur les capteurs) et comparé les résultats à ceux obtenus en absence de glycérol et de BSA. Chaque solution a été divisée en 10 aliquotes. Le premier a servi à mesurer l'activité enzymatique initiale par spectrophotométrie. Les suivants ont été utilisés pour la mesurer après 7, 15, 20, 35 jours et 5 mois de conservation à 4°C ou -20°C. Les figures II.12 a et II.12 b mettent en évidence une perte rapide d'activité catalytique lorsque l'enzyme est conservée à 4°C, ceci en présence ou non de BSA et de glycérol. Par contre, aucune variation significative de l'activité n'est observée après 35 jours de conservation à -20°C.

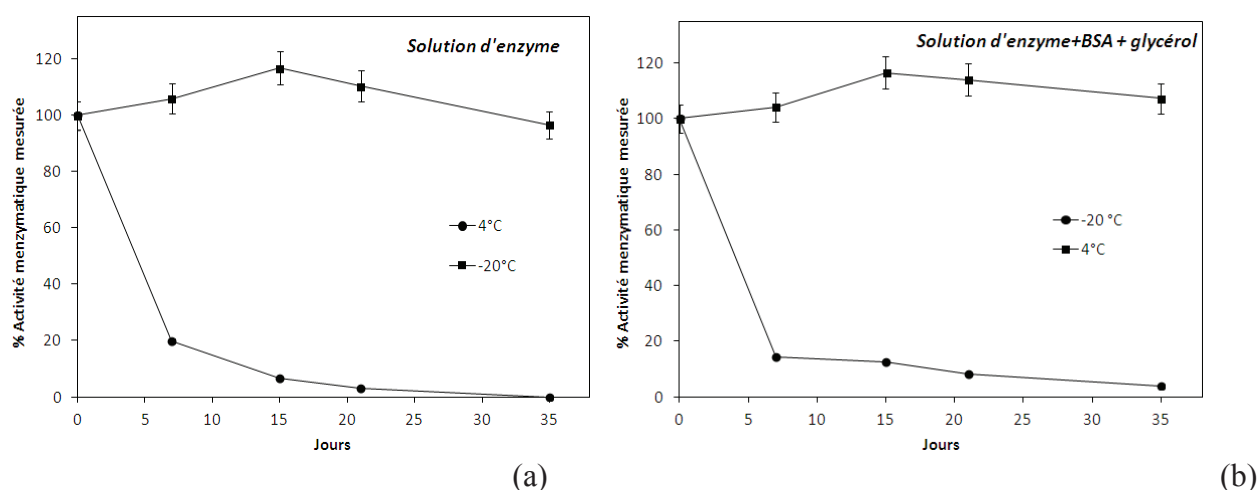


Fig.II.12 : Comparaison de l'activité enzymatique de deux solutions d'AOX avec (a) et sans (b) présence de glycérol conservées soit à 4°C soit à -20°C

Une autre expérience a consisté à mesurer sur 16 jours l'activité enzymatique d'une solution contenant la BSA et le glycérol. Cette solution, conservée à -20°C, subit dans ce cas des cycles de congélation/décongélation lors de chaque mesure. Nous pouvons constater que, dans ce cas

(figure II.13), l'enzyme perd environ 40 % de son activité au bout de 5 cycles.

Il est donc préférable, pour conserver l'activité catalytique de l'enzyme, de préparer des solutions fraîches et en petite quantité, ou d'aliqoter les solutions, afin d'éviter les cycles de congélation/décongélation.

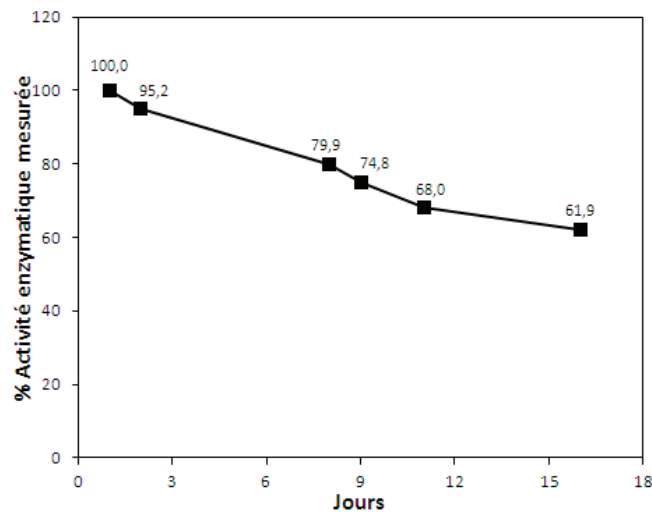
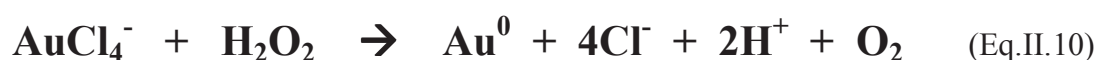


Fig.II.13 : Evolution de l'activité catalytique d'une solution contenant 5 % (m/v) d'AOX, 5 % (m/v) de BSA et 10 % (m/v) de glycérol conservée à -20°C et subissant des cycles de congélation/décongélation à chaque mesure

II.3.4 Influence de la composition de la membrane enzymatique sur la réponse du biocapteur

II.3.4.1 Ajout de nanoparticules d'or

Une étude réalisée par Zayats *et al.*³⁰ a mis en évidence qu'il était possible de réaliser la croissance de nanoparticules d'or à la surface de plaques en verre par biocatalyse en présence de glucose oxydase (GOD). L'oxydation du glucose par la GOD est en effet à l'origine de la production d'H₂O₂. L'ajout de tétrachloroaurate (III) de sodium (NaAuCl₄) et de chlorure de cétyle triméthyl ammonium (agent tensioactif), en présence du H₂O₂, conduit à la précipitation d'Au⁰, ce qui peut être mis à profit pour faire croître des nanoparticules déposées au préalable à la surface des plaques. La réaction mise en jeu, présentée ci-dessous (Eq.II.10), produit des ions détectables par conductimétrie.



Cette approche a donc pu être mise à profit dans notre travail puisque l'oxydation du méthanol en présence d'AOX conduit également à la production de H₂O₂. Des nanoparticules d'or ont été

déposées à la surface du transducteur comme décrit dans la partie expérimentale et différentes concentrations de NaAuCl_4 (100 à 1000 μM) ont été ajoutées dans l'électrolyte de mesure.

La comparaison des figures II.14 et II.15 met en évidence une amélioration du signal obtenu pour 1 mM de MeOH d'un facteur 2 environ lorsqu'on ajoute les nanoparticules en surface du transducteur. Par contre, l'ajout de NaAuCl_4 ne s'avère efficace qu'à partir d'une concentration supérieure à 800 μM (Fig. II.14). Aucun signal n'a pu être enregistré après contact avec la solution à 1 mM de NaAuCl_4 , et un dépôt d'or a pu être observé à la surface de l'électrode. Ce dépôt crée vraisemblablement un court-circuit ou bloque le contact entre les ions et les bandes interdigitées.

La méthode évaluée étant relativement complexe et ne permettant pas d'améliorer de manière très importante le signal du biocapteur, nous avons décidé de l'abandonner.

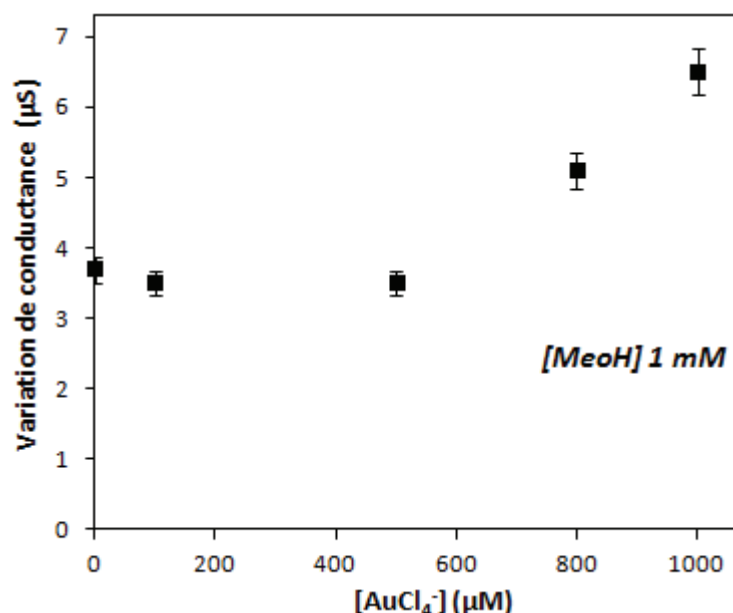


Fig.II.14 : Réponse du biocapteur en fonction de la concentration en AuCl_4^- . [MeOH] = 1 mM. Mesure dans du tampon phosphate 5 mM pH 7

II.3.4.2 Ajout de HRP

Dans cette partie, nous avons cette fois cherché à évaluer l'amélioration pouvant être apportée par l'ajout de HRP. Trois capteurs ont donc été préparés en déposant en première couche 0,3 μL de la solution enzymatique contenant l'AOX d'*H. polymorpha* (5 % (m/v) de solide), 5 % (m/v) de BSA et 10 % (m/v) de glycérol, puis en deuxième couche 0,3 μL de la même solution où l'AOX a été remplacée par la HRP (15 % (m/v)). La variation moyenne de conductance obtenue pour une concentration de méthanol de 1 mM est comparée à celle enregistrée dans les mêmes conditions pour 3 biocapteurs contenant l'AOX uniquement (figure II.15). Nous voyons que l'ajout de HRP permet

quasiment de doubler le signal conductimétrique.

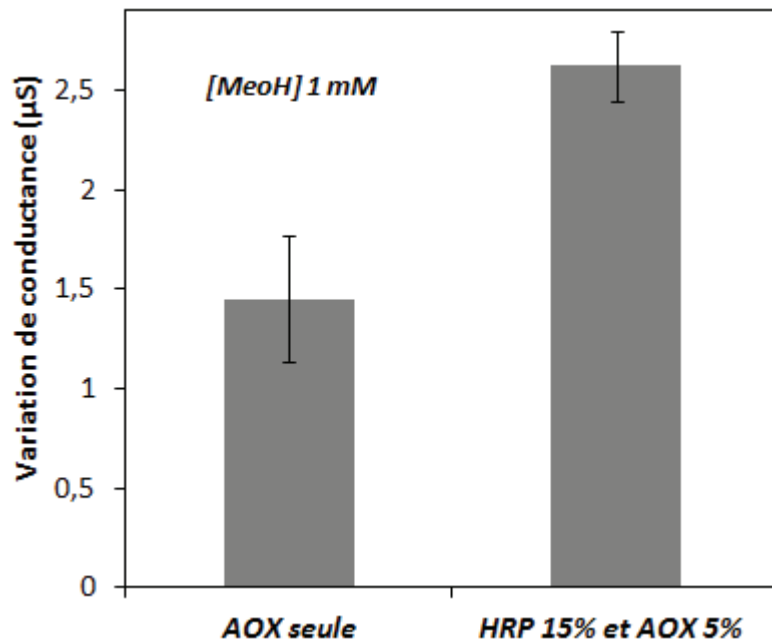
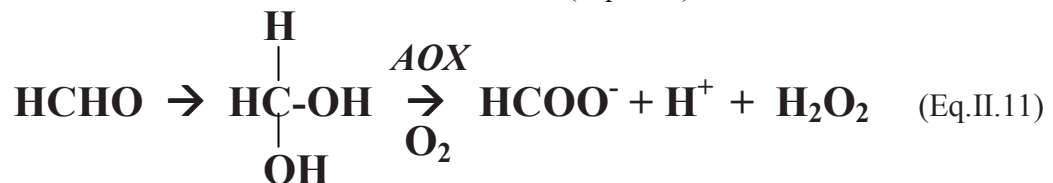


Fig.II.15 : Influence de l'ajout de HRP sur le signal du biocapteur conductimétrique. [MeOH] 1 mM. Mesure dans du tampon phosphate 5 mM pH 7

Ainsi que nous l'avons vu dans la partie bibliographique, l'oxydation du méthanol catalysée par l'AOX produit du formaldéhyde (Eq.I.54). Cette réaction ne permet pas, à elle seule, d'expliquer l'augmentation de la conductance du milieu après injection de méthanol. Par contre, l'AOX possède une affinité vis-à-vis de ce dernier très proche de celle vis-à-vis de l'alcool (Table.II.2). Il est donc raisonnable de penser que le formaldéhyde produit, sous forme hydratée en milieux aqueux, s'oxyde en présence de l'enzyme, conduisant à la production de protons et d'ions formiates dans le milieu mesure, à l'origine de la variation de conductance observée (Eq.II.11).



La HRP est quant à elle connue pour être un excellent catalyseur de l'oxydation de nombreux substrats réducteurs en utilisant H_2O_2 comme agent oxydant. Dans notre cas, le substrat réducteur peut être HCHO , qui est alors oxydé en acide formique (Eqs II.12 et II.13). Le signal obtenu en utilisant la combinaison AOX/HRP est plus élevé qu'avec l'AOX seule, indiquant une meilleure efficacité d'oxydation du formaldéhyde par la HRP que par l'AOX, déjà mise à contribution pour la transformation du méthanol en formaldéhyde.



II.3.4.3 Quantité d'alcool oxydase

Nous avons vu dans le chapitre bibliographique comment évolue la vitesse d'une réaction enzymatique avec la concentration en substrat et en enzyme (§I.3.5.3). Le comportement de l'enzyme, lorsqu'elle est immobilisée sur une surface, peut cependant être tout-à-fait différent de celui qu'elle présente lorsqu'elle est libre en solution et dépend de sa nature (protéine « dure » ou « molle »)³¹. La quantité d'enzyme déposée sur le capteur est donc un paramètre important qu'il est indispensable d'optimiser.

Dans ce travail, trois biocapteurs AOX/HRP ont été préparés en maintenant la quantité d'HRP constante (0,045 mg de solide) et en faisant varier celle d'AOX (0,015 et 0,03 mg de solide) par dépôt de 0,3 µL de la solution d'AOX à 5 ou à 10 % de solide, ou de 2 fois 0,3 µL de la solution d'AOX à 5 % de solide.

Ainsi que le montrent les figures II.16 a et II.16 b, la vitesse initiale ainsi que la variation de conductance à l'équilibre obtenues pour ces trois biocapteurs augmentent de manière linéaire avec la concentration en méthanol dans le domaine étudié (0-5 mM). A une concentration donnée en substrat, et quelle que soit la méthode de dépôt, les valeurs de vitesse et de conductance sont multipliées par un facteur 2,5 environ lorsque la quantité d'AOX est doublée, montrant l'effet limitant de la concentration en enzyme dans le domaine de concentration en substrat étudié. La limite de détection obtenue par mesure de la conductance passe par ailleurs de 150 µM à 70 µM. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus sur d'autres biocapteurs électrochimiques à base d'AOX^{8, 16, 18, 19, 32, 33}. Ainsi, par exemple, les réponses des biocapteurs de Barsan et Brett¹⁸ et Guzman-Vasquez de Prada *et al*³² croissent avec la quantité d'AOX, de même que les intensités obtenues pour les biocapteurs de Patel *et al*¹⁶ augmentent d'un facteur 8 lorsque la quantité d'enzyme dans la membrane est multipliée par 10. Par contre, Costa-Rama *et al.*⁸ atteignent une saturation du signal tandis qu'Akin *et al*¹⁹ montrent qu'il existe une valeur optimale au-delà de laquelle la réponse du biocapteur diminue. Il semble, dans notre cas, que la concentration maximale d'AOX testée n'ait pas été suffisante pour observer ces phénomènes.

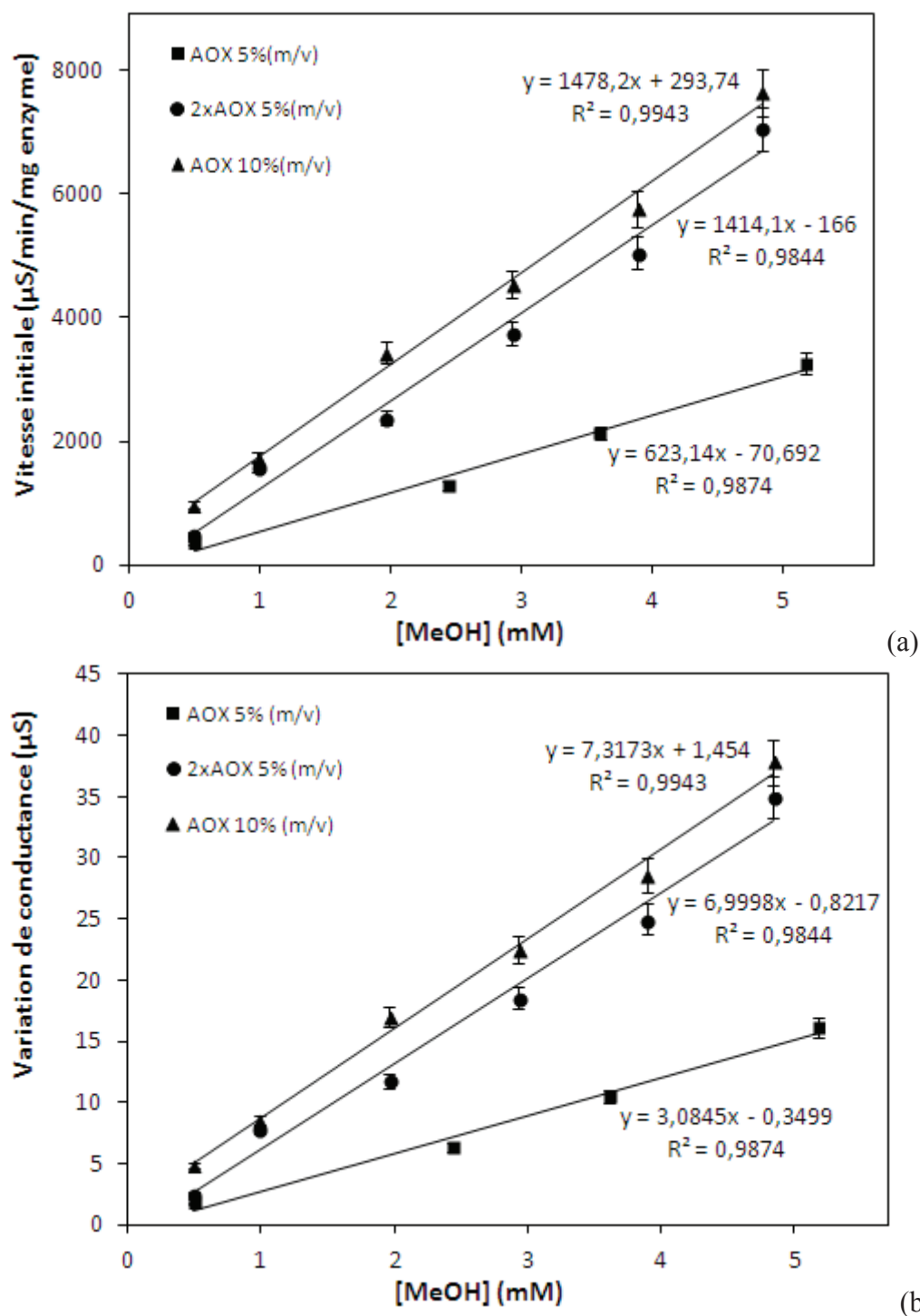


Fig.II.16 : Influence de la quantité d'AOX (*H. polymorpha*) sur la réponse des biocapteurs. Immobilisation : vapeurs de GA, 30 min. Mesure dans le tampon phosphate 5 mM pH 7
 (a) : en terme de vitesse initiale – (b) : en terme de variation de conductance

Néanmoins, nous avons observé une forte diminution de la stabilité des biomembranes à la plus forte teneur en AOX. Après un jour de conservation dans le tampon phosphate, même lorsque le temps de réticulation est augmenté à 45 min, les biomembranes se décrochent partiellement, rendant les biocapteurs inutilisables. Il est probable que la réticulation ne puisse se faire de manière

homogène à trop forte densité d'enzyme¹⁹. Les expériences suivantes ont donc été réalisées avec 0,015 mg d'AOX.

II.3.4.4 Quantité de BSA

La BSA est une protéine inerte riche en résidus lysines qui entrent en jeu dans le processus de réticulation. En opérant à un rapport BSA/enzyme approprié, il est possible de limiter les réactions impliquant les résidus lysines de l'AOX, qui pourraient conduire à des changements de conformation de l'enzyme et donc à une perte d'activité. Les études précédentes avaient été réalisées à un rapport massique de 1. Ainsi que le montre la figure II.17, doubler la proportion de BSA par rapport à l'enzyme conduit à une diminution de la sensibilité du biocapteur, ce qui peut provenir d'une adsorption du substrat sur la BSA ou d'une trop forte densité du réseau formé, à l'origine de problèmes de diffusion. De plus, les membranes sont moins stables avec cette proportion et se décollent de la surface du transducteur après un jour de conservation. Le rapport 1:1 a donc été conservé par la suite. Ce même rapport avait également été préconisé par Gouveia-Caridade *et al*²⁸.

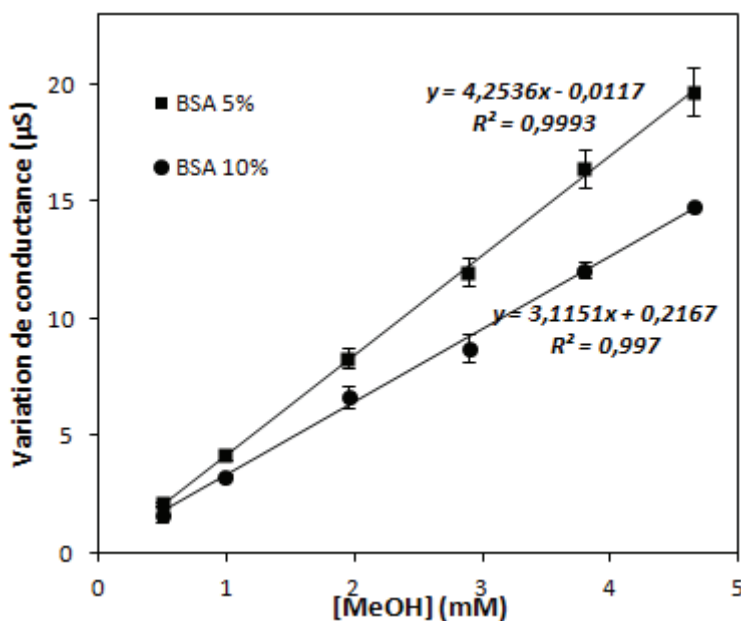


Fig.II.17 : Influence de la quantité de BSA sur la réponse du biocapteur bienzymatique AOX 10 %, HRP 15 %. Immobilisation : vapeurs de GA, 45 min. Mesure dans le tampon phosphate 5 mM pH 7

II.3.4.5 Temps de réticulation

Différents paramètres tels que la température, la concentration en GA et le temps d'exposition peuvent affecter la réaction de réticulation et par conséquent la stabilité et la perméabilité de la biomembrane. Compte tenu des données de la littérature et pour des raisons d'ordre pratique, la

réaction a été réalisée à température ambiante en utilisant des vapeurs de GA générées à partir d'une solution aqueuse commerciale à 25 %. Seul le temps de réaction a été modifié. Nous avons testé 30 et 45 min, deux biocapteurs étant fabriqués pour chaque temps.

On constate une légère amélioration de la réponse conductimétrique lorsque le temps de réticulation passe de 30 à 45 min (Fig.II.18). Par contre, il n'y a pas d'influence majeure du temps d'exposition aux vapeurs de GA sur la limite de détection du capteur (154 μ M). Ceci s'explique par la valeur du bruit de fond qui s'est avéré plus élevé pour 45 min d'exposition que pour 30 min. Il est probable qu'un temps d'exposition trop long, à l'origine de la formation d'un réseau plus dense, gêne la diffusion des ions et provoque une augmentation du bruit de fond. Un temps de réticulation de 30 min a donc été choisi pour la suite des expériences.

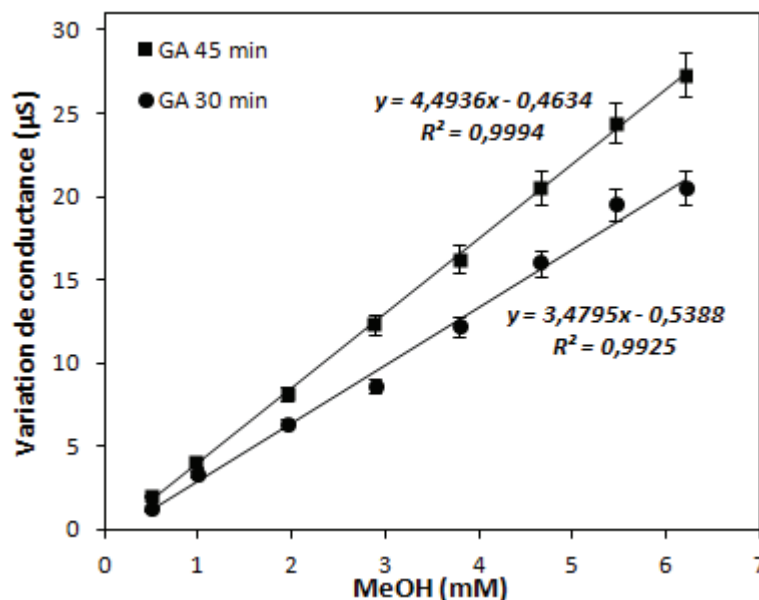


Fig.II.18 : Influence du temps d'exposition au GA sur la réponse du biocapteur bienzymatique AOX 5 %, HRP 15 %, BSA 5 % (m/v. Mesure dans le tampon phosphate 5 mM pH 7

II.3.5 Influence de la composition de l'électrolyte de mesure

II.3.5.1 Influence du pH du milieu

Le pH est un facteur pouvant avoir une influence sur la conformation de l'enzyme, et donc son activité catalytique. Le pH optimal de fonctionnement de l'enzyme peut être néanmoins très différent de celui de l'enzyme immobilisée^{29, 33}.

D'après les documents fournis par la société Sigma-Aldrich, les enzymes AOX (*H. polymorpha*) et HRP libres disposent d'une activité maximale à pH 8,5³⁴ et 6³⁵, respectivement. Toutefois, sur tous les capteurs utilisant soit uniquement l'AOX soit une combinaison de l'AOX

avec la HRP, un décalage du pH optimal a été systématiquement observé. Dans le cas des capteurs incluant seulement l'AOX^{16, 18, 26-28}, les valeurs de pH optimal sont comprises entre 7,4 et 7,6. Lorsque la HRP entre également dans la composition de la biomembrane, un pH optimal à 7,5³⁶ mais aussi à 7³⁷ a été rapporté. C'est cette dernière valeur que nous avons également obtenue pour notre biocapteur après avoir testé cinq valeurs différentes de pH (Fig.II.19). Les mesures suivantes ont donc été réalisées dans le tampon phosphate pH 7.

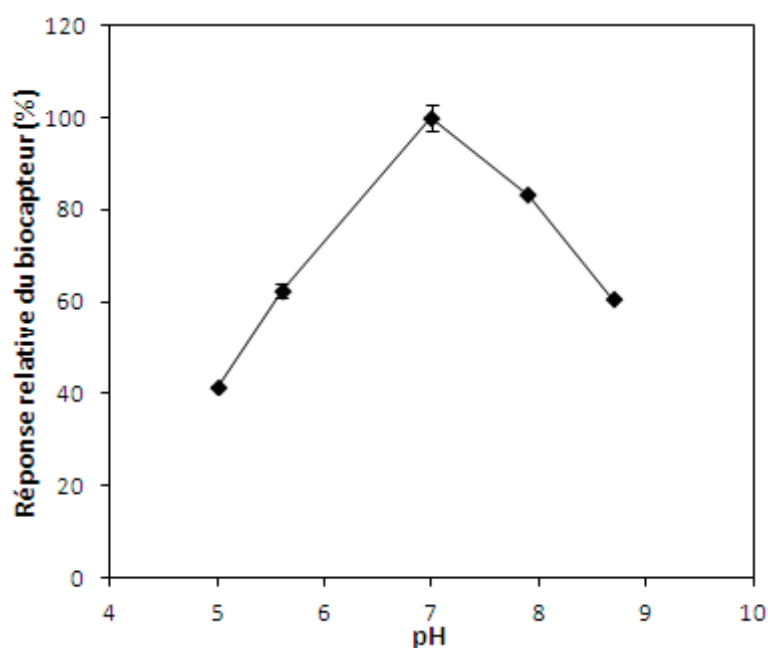


Fig.II.19 : Influence du pH du milieu sur le fonctionnement du biocapteur conductimétrique bienzymatique AOX 5 %, HRP 15 %. Immobilisation : vapeurs de GA, 30 min. [MeOH = 2,9 mM. Mesure dans du tampon phosphate 5 mM.

II.3.5.2 Influence de la concentration en tampon

La concentration en tampon du milieu de mesure est un paramètre important qui peut influencer la réponse du biocapteur en modifiant les propriétés électriques de l'interface électrode/électrolyte, la concentration locale des ions et les mobilités ioniques.

Dans ce travail, nous avons évalué l'influence de la concentration en tampon phosphate sur le signal du biocapteur bi-enzymatique AOX/HRP dans la gamme 1-10 mM. Comme on peut le voir sur la figure II.20, les concentrations situées dans le domaine 2-5 mM conduisent aux intensités maximales. La meilleure reproductibilité étant par ailleurs obtenue à une concentration en tampon de 5 mM, c'est cette concentration de mesure que nous avons choisie pour la suite de notre travail.

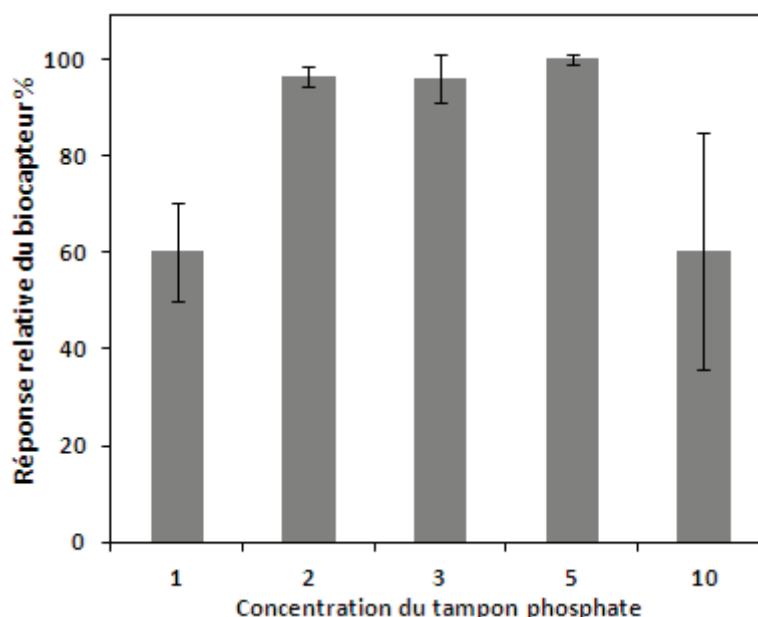


Fig.II.20: Influence de la concentration du tampon sur les réponses du biocapteur AOX/HRP
[MeOH] = 3,25 mM dans du tampon phosphate pH 7

II.3.6 Caractéristiques analytiques du biocapteur AOX/HRP

Les caractéristiques analytiques du biocapteur développé ont ensuite été déterminées dans les conditions optimales définies précédemment.

La réponse du biocapteur bi-enzymatique AOX/HRP est linéaire dans la gamme de concentration de méthanol allant jusqu'à 10 mM au moins avec une sensibilité de $3 \mu\text{S} \cdot \text{mM}^{-1}$. La limite de détection obtenue comme étant la concentration conduisant à trois fois le rapport signal sur bruit ($S/N=3$) est de l'ordre de 150 μM . Le domaine linéaire obtenu est bien plus large que celui du biocapteur AOX/catalase développé précédemment au laboratoire. Il n'allait en effet que jusqu'à 75 μM . La stabilité de la membrane est par ailleurs considérablement améliorée. Par contre, la sensibilité est presque 130 fois plus faible et la limite de détection 300 fois plus élevée. Ces résultats peuvent être liés à la modification du mode d'immobilisation ou au remplacement de la catalase par la HRP.

Les coefficients de variation obtenus à partir de trois mesures d'une même solution dans la gamme de concentration étudiée, testée dans la même journée, se situent entre 5 et 7 %. De même, la reproductibilité inter-capteur mesurée pour une concentration en méthanol de 1 mM est de l'ordre de 4 %.

La stabilité de stockage à long terme du biocapteur bi-enzymatique a également été étudiée sur une période de 39 jours, en conservant le capteur dans tampon phosphate 20 mM pH 7 à 4°C après chaque journée de travail. Dans ces conditions, et en effectuant trois répliques à 3 mM de MeOH par jour de mesure, le biocapteur s'avère stable pendant les 39 jours (Fig.II.21). Ce résultat montre que la

méthode d'immobilisation choisie est tout-à-fait appropriée et permet de conserver l'activité de l'enzyme sur une longue période.

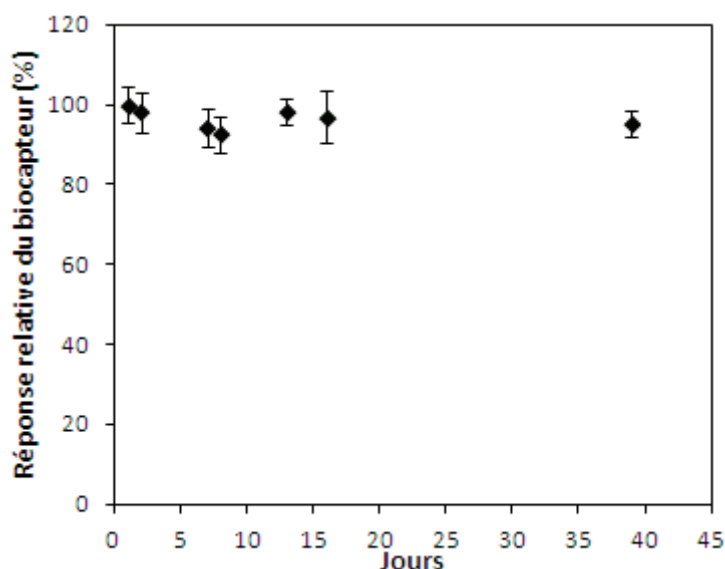


Fig.II.21: Stabilité de stockage du biocapteur bienzymatique AOX/HRP pendant 40 jours.
[HCHO] = 3,25 mM dans du tampon phosphate 5 mM pH 7

Nous avons ensuite déterminé la réponse du biocapteur vis-à-vis de différentes substances potentiellement interférentes telles que d'autres alcools primaires (éthanol, n-propanol et n-butanol). Nous voyons sur la figure II.22 que, comme attendu, la réponse du biocapteur diminue lorsque la longueur de la chaîne alkyle augmente. La réponse du biocapteur vis-à-vis de l'éthanol, du n-propanol et du n-butanol (3 mM) représente respectivement 90 %, 70 % et 60 % de celle observée pour le méthanol à la même concentration. La même tendance a été également observée dans les travaux de Barsan et Brett¹⁸, Akin *et al*¹⁹ et Alferov *et al*²⁷ réalisés sur des biocapteurs monoenzymatiques à AOX, ou avec le capteur bi-enzymatique AOX/catalase développé dans notre laboratoire¹. La diminution du signal observée n'est cependant pas aussi forte que nous aurions pu espérer compte tenu de la valeur des constantes d'affinité respectives de l'AOX vis-à-vis des différents alcools (Tab. II.2). L'immobilisation des enzymes est vraisemblablement à l'origine d'une perte de sélectivité. La valeur de K_M apparente déterminée à partir des pentes initiales de la réponse du biocapteur vis-à-vis du méthanol est de 49,7 mM, nettement supérieure à la valeur publiée de 2,15 mM. Toutefois, cette valeur de K_M apparente est déterminée à partir de la réponse du biocapteur, elle dépend donc non seulement de la cinétique enzymatique mais également de celle de diffusion du substrat et des produits de réaction à travers la membrane.

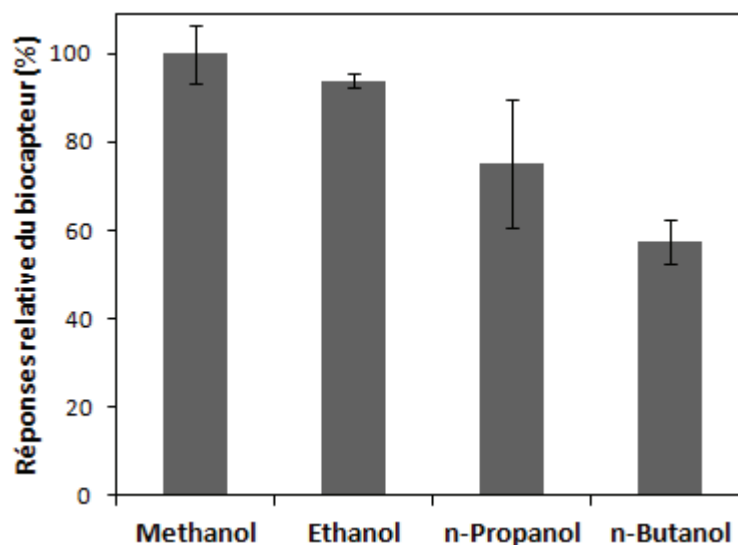


Fig.II.22: Influence de la concentration du tampon sur les réponses du biocapteur AOX/HRP
[MeOH] = 3,25 mM dans du tampon phosphate pH 7

II.4. Conclusion

Cette première partie de notre travail a été consacrée à l'optimisation d'un biocapteur conductimétrique utilisant l'AOX comme biorécepteur pour la détection des alcools à chaînes courtes. Parmi les trois AOXs commerciales évaluées (*Hansenula polymorpha*, *Candida boidinii* et *Pichia pastori*), *H. polymorpha* s'est avérée être à la fois la plus performante et la moins coûteuse. Trois types de microélectrodes interdigitées se caractérisant par des dimensions, des géométries et des substrats différents ont également été testés. Notre choix final s'est porté sur des transducteurs fabriqués par l'Institut de Physique des Semi-conducteurs Lashkaryov (IPSL, Ukraine) dont la surface sensible est d'environ 1 mm², et dont la largeur des doigts ainsi que l'espace interdigital est de 20 µm. Ces transducteurs permettent d'atteindre la meilleure sensibilité tout en garantissant une bonne adhésion de la biomembrane. Nous avons montré que l'ajout de HRP conduisait à une augmentation significative du signal. Malgré une faible sélectivité entre le méthanol et l'éthanol, ce que les valeurs des constantes d'affinité de l'AOX libre (K_M) ne permettaient pas de prévoir, le biocapteur bienzymatique AOX/HRP répond linéairement de 0,4 à au moins 10 mM de méthanol avec une limite de détection de 150 µM dans les conditions optimales de composition de la biomembrane (0,015 g d'AOX ; 0,045 g d'HRP ; 0,015 g de BSA et 30 min de réticulation par le GA) et du milieu de mesure (tampon phosphate 5 mM pH 7). Le domaine de linéarité ainsi que la robustesse du biocapteur proposé sont nettement meilleurs que ceux du biocapteur AOX/catalase développé précédemment au laboratoire.

Références

1. Hnaïen, M.; Lagarde, F.; Jaffrezic-Renault, N., A rapid and sensitive alcohol oxidase/catalase conductometric biosensor for alcohol determination. *Talanta* **2010**, 81, 222-227.
2. Bonnard, N.; Falcy, M.; Jargot, D.; Pasquier, E., Ethanol. Fiche toxicologique INRS FT48 **2011**, 8 pp. <http://www.inrs.fr/accueil/produits/bdd/doc/fichetox.html?refINRS=FT%2048>. Accédé le 27/09/2013.
3. Liu, Q.; Kirchhoff, J.R., Amperometric detection of methanol with a methanol dehydrogenase modified electrode sensor. *J. Electroanal. Chem.* **2007**, 601, 125-131.
4. Abramson, S.; Singh, A.K., Treatment of the alcohol intoxications : ethylene glycol, methanol and isopropanol. *Curr. Opin. Nephrol. Hy.* **2000**, 9, 695-701.
5. INRS, Services Techniques et Médicaux, Méthanol. Fiche toxicologique FT5 **2009**, 6 pp. <http://www.inrs.fr/accueil/produits/bdd/doc/fichetox.html?refINRS=FT%205>. Accédé le 27/09/2013.
6. Kruse, J.A. Review article : Methanol poisoning. *Intensive Care Med.* **1992**, 18, 391 - 397.
7. Azevedo, A.M.; Prazeres, D.M.F.; Cabral, J.M.S.; Fonseca, L.P., Review : Ethanol biosensors based on alcohol oxidase. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 21, 235-247.
8. Costa Rama, E ; Biscay, J.; Gonzalez Garcia, M.B.; Julio Reviejo, A.; Pingarron Carrazon, J.M.; Costa Garcia, A., comparative study of different alcohol sensors based on screen-printed carbon electrodes. *Anal. Chim. Acta* **2012**, 728, 69-76.
9. Akyilmaz, E.; Dinçkaya, E, An amperometric microbial biosensor development based on *Candida tropicalis* yeast cells for sensitive determination of ethanol. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 20, 1263-1269.
10. Zhao, C.; Li, H.; Zheng, J.; Chen, L.; Li, F.; Yang, S.; Dong, C.; Choi, M. M. F., Isolation of a *Methylobacterium organophilium* strain and its application to a methanol biosensor. *Microchim. Acta* **2009**, 167, 67-73.
11. Šefčovičová, J.; Filip, J.; Mastihuba, V.; Gemeiner, P.; Tkac, J., Analysis of ethanol in fermentation samples by a robust nanocomposite-based microbial biosensor. *Biotechnol. Lett.* **2012**, 34, 1033-1039.
12. Guo, K.; Qian, K.; Zhang, S.; Kong, J.; Yu, C.; Liu, B., Bio-electrocatalysis of NADH and ethanol based on graphene sheets modified electrodes. *Talanta* **2011**, 85, 1174 - 1179.

13. Periasamy, A.P.; Umasankar, Y.; Chen, S.-M., Toluidine blue adsorbed on alcohol dehydrogenase modified glassy carbon electrode for voltammetric determination of ethanol. *Talanta* **2011**, 83, 930-936.
14. Zhang, M.; Gorski, W. Amperometric ethanol biosensors based on chitosan-NAD⁺-alcohol dehydrogenase films. *Electroanalysis* **2011**, 23, 1856 - 1862.
15. Nicolau, E.; Méndez, J.; Fonseca, J.J.; Griebenow, K.; Cabrera, C.R., Bioelectrochemistry of non-covalent immobilized alcohol dehydrogenase on oxidized diamond nanoparticles. *Bioelectrochemistry* **2012**, 85, 1-6.
16. Patel, N.G.; Meier, S.; Cammann, K.; Chemnitz, G.C., Screen-printed biosensors using different alcohol oxidases. *Sens. Actuators B* **2001**, 75, 101-110.
17. Bucur, B.; Bucur, M.P.; Radu, G.L., Improvement of the storage stability for biosensors based on alcohol oxidase immobilized by entrapment in a photopolymerisable matrix. *Rev. Chim.* **2007**, 58, 1145-1148.
18. Barsan, M.M.; Brett, C.M.A., An alcohol oxidase biosensor using PNR redox mediator at carbon film electrodes. *Talanta* **2008**, 74, 1505-1510.
19. Akin, M.; Yuksel, M.; Geyik, C.; Odaci, D.; Bluma, A.; Höpfner, T.; Beutel S.; Scheper, T.; Timur, S., Alcohol biosensing by Polyamidoamine (PAMAM)/Cysteamine/Alcohol oxidase-modified gold electrode. *Biotechnol. Progr.* **2009**, 26, 896-906.
20. Das, M.; Goswami, P., Direct electrochemistry of alcohol oxidase using multiwalled carbon nanotube as electroactive matrix for biosensor application. *Bioelectrochemistry* **2013**, 89, 19-25.
21. Anthony, C.; Williams, P., The structure and mechanism of methanol dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, 1647, 18-23.
22. Eys, J.V.; Kaplan, N.O., Yeast Alcohol Dehydrogenase. III. Relation of Alcohol Structure to Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 2782-2786.
23. Leskovac, V.; Trivic, S.; Pericin, D., The three zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **2002**, 2, 481-494.
24. Monosik, R.; Stredansky, M.; Tkac, J.; Sturdik, E., Application of Enzyme Biosensors in Analysis of Food and Beverages. *Food Anal. Methods* **2012**, 5, 40-53.
25. Yildiz, H.B.; Toppare, L., Biosensing approach for alcohol determination using immobilized alcohol oxidase. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, 21, 2306-2310.
26. Wen, G.; Zhang, Y.; Shuang, S.; Dong, C.; Choi, M.M.F., Application of a biosensor for monitoring of ethanol. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 23, 121-129.

27. Alferov, V.A.; Zaitsev, M. G.; Ponomareva, O. N.; Kuznetsova, T. A.; Rogova, T. V.; Reshetilov, A. N., An alcohol oxidase based electrochemical sensor for the rapid determination of lower alcohols. *J. Anal. Chem.* **2011**, 66, 1205-1211.
28. Gouveia-Caridade, C.; Pauliukaite, R.; Brett, C.M.A., Development of electrochemical oxidase biosensors based on carbon nanotube-modified carbon film electrodes for glucose and ethanol. *Electrochim. Acta* **2008**, 53, 6732-6739.
29. Kiralp, S.; Topcu, A.; Bayramoglu, G.; Aricab, M.Y.; Toppare, L., Alcohol determination via covalent enzyme immobilization on magnetic beads. *Sens. Actuators B* **2008**, 128, 521-528.
30. Zayats, M.; Baron, R.; Popov, I.; Willner, I., Biocatalytic growth of Au nanoparticles: From mechanistic aspects to biosensors design. *Nano Lett.* **2005**, 5, 21-25.
31. Talbert, J.N.; Goddard, J.M., Enzymes on material surfaces. *Colloids Surf. B* **2012**, 93, 8-19.
32. Guzman-Vasquez de Prada, A.; Pena, N.; Mena, M.L.; Reviejo, A.J.; Pingarron, J.M., Graphite/Teflon composite bienzyme amperometric biosensors for monitoring of alcohols. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, 18, 1279-1288.
33. Türkarslan, Ö.; Büyükbayram, A.E.; Toppare, L., Amperometric alcohol biosensors based on conducting polymers: polypyrrole, poly(3,4-ethylenedioxythiophene) and poly(3,4-ethylenedioxythiophene). *Synth. Met.* **2010**, 160, 808-813.
34. Couderc, R.; Baratti, J., Oxidation of methanol by the yeast, *Pichia pastoris*. Purification and properties of the alcohol oxidase. *Agric. Biol. Chem.* **1980**, 44, 2279-2289.
35. Karasyova, E.I.; Naumchik, I.V.; Metelitz, D.I., Activation of peroxidase-catalyzed oxidation of aromatic amines with 2-aminothiazole and melamine. *Biochem.* **2003**, 68, 54-62.
36. Smutok, O.; Ngounou, B.; Pavlishko, H.; Gayda, G.; Gonchar, M.; Schuhmann, W. A., reagentless bienzyme amperometric biosensor based on alcohol oxidase/peroxidase and an Os-complex modified electrodeposition paint. *Sens. Actuators B* **2006**, 113, 590-598.
37. Alpeeva, I.S.; Vilkanauskite, A.; Ngounou, B.; Csöregi, E.; Sakharov, I.Y.; Gonchar, M.; Schuhmann, W., Bi-enzyme alcohol biosensors based on genetically engineered alcohol oxidase and different peroxidases. *Microchim. Acta* **2005**, 152, 21-27.

CHAPITRE III

III.1 Introduction

III.1.1 Généralités sur le lactate

L'acide lactique est un acide carboxylique à trois atomes de carbone très largement répandu dans la nature. Il s'agit d'un liquide non volatil et incolore qui peut être chimiquement synthétisé ou naturellement produit par les organismes eucaryotes et procaryotes à partir des hydrates de carbone tels que le glucose, le lactose ou le sucrose via le processus de fermentation. C'est le chimiste suédois Scheele qui, le premier, a découvert la présence de lactate dans le yaourt en 1780. Ce composé a ensuite été produit par Charles E. Avery à Littleton, Massachusetts, États-Unis en 1881¹.

L'acide lactique possède deux stéréo-isomères, l'acide L-lactique étant l'énantiomère le plus abondant chez les mammifères (Tableau.III.1). Dans les aliments et les boissons, la transformation des glucides en acide lactique s'effectue principalement par les bactéries lactiques telles que *Aerococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* ou *Pediococcus* (Fig.III.1). La proportion des isomères D et L formés au cours de ce processus varie en fonction des souches bactériennes. Certaines d'entre elles (par exemple les probiotiques) synthétisent principalement du L-lactate, tandis que d'autres forment un mélange de D et L-lactate, avec une proportion plus importante en D-lactate^{2,3}.

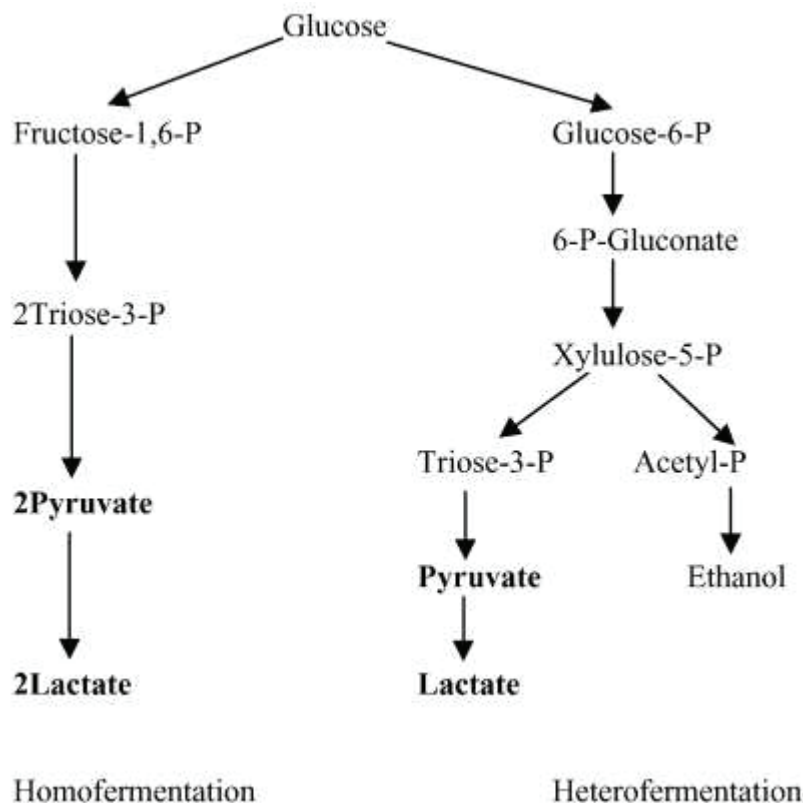


Fig.III.1: Schéma simplifié des voies majeures de fermentation du glucose par les bactéries lactiques

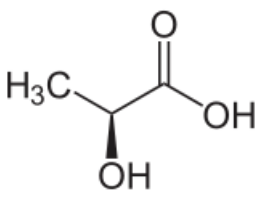
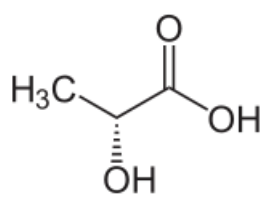

Nom	Acide lactique ou Acide 2-hydroxypropanoïque
Formule chimique	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>L-Lactique</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>D-Lactique</p> </div> </div>
Masse molaire	90,08 g.mol ⁻¹
Point de fusion	D/L : 16,8°C L : 53°C D : 53 °C
Masse volumique	1,25 g.cm ⁻³
Point d'ébullition	122°C à 14 mm Hg 82°C à 0,5 mm Hg
pK_a	3,86 (20°C)
Solubilité	Miscible avec l'eau, l'alcool, le glycérol, et le furfural Légèrement soluble dans l'éther Insoluble dans le chloroforme, l'éther de pétrole, le disulfure de carbone
Précautions	

Tableau.III.1 : Caractéristiques physico-chimiques de l'acide lactique

L'acide L-lactique a de nombreuses applications industrielles. Cet acide entre ainsi dans la composition de divers produits pharmaceutiques et cosmétiques ^{1,4}. Sa forme polymérique possède par ailleurs l'avantage d'être thermoplastique et biodégradable, ce qui lui vaut d'être utilisée dans le domaine médical pour la fabrication de pansements chirurgicaux, les sutures ou les implants orthopédiques⁵. Cependant, les applications les plus connues concernent l'industrie alimentaire. L'acide lactique (E270) est en effet employé comme acidifiant ou comme agent de conservation ou agent aromatisant dans une grande variété d'aliments du fait de son goût acide plus doux que celui d'autres acides alimentaires. Sa teneur est considérée comme un paramètre important affectant la saveur ou étant en corrélation avec la fraîcheur de nombreux aliments et boissons tels que le vin, le lait, les produits laitiers, les fruits ou les légumes ³. Selon la réglementation française, les yaourts

produits à partir des bactéries lactiques thermophiles spécifiques *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*, qui doivent êtreensemencées simultanément et se trouver vivantes dans le produit fini au moment de la vente aux consommateurs, doivent contenir une teneur en acide lactique supérieure à 0,7 g pour 100 g de yaourt. Les laits fermentés comportent un peu moins d'acide lactique libre que le yaourt (0,6 % au lieu de 0,7 %), ce qui leur donne un goût plus doux. Dans les laits frais, la concentration en acide lactique se situe entre 1,5 et 18 g/L⁶. La directive 2001/112/CE fixe la teneur maximale en acide lactique dans les nectars de fruits, de légumes et produits similaires à 5000 mg/l ou mg/kg selon le cas⁷. L'utilisation de cet additif pour acidifier les moûts de raisin et les vins est par ailleurs autorisée par l'Union Européenne depuis le 1er août 2009, les teneurs maximales admissibles étant de 1,8 g/L d'acide lactique dans les moûts et 3 g/L d'acide lactique dans les vins⁸.

Chez l'Homme, la concentration physiologique du lactate dans le sang varie de 0,6 à 2 mM. Cette concentration peut rapidement s'élever à 20-30 mM pendant l'activité physique⁴ ou dans certaines conditions pathologiques, par exemple en cas de maladies cardiaques, d'insuffisance respiratoire ou de diabète. La formation d'isomère D a des effets négatifs puisque dans le métabolisme des mammifères, notamment chez l'Homme, cet isomère est bien plus difficile à métaboliser que le L-lactate, et une teneur importante dans l'organisme peut entraîner de sérieux dysfonctionnements⁹. Dans les conditions normales, le D-lactate ne représente qu'environ 1 à 5 % de la concentration totale en lactate. Un niveau élevé de D-lactate dans le sang et l'urine provient généralement de perturbations de la voie glyoxalase ou de la surproduction bactérienne dans l'intestin.

Par conséquent, la surveillance de la teneur en L- et D-lactate dans les fluides biologiques et dans les produits alimentaires est d'une grande importance pour le diagnostic clinique et pour l'évaluation de la qualité des aliments.

III.1.2 Biocapteurs enzymatiques pour la détermination du lactate

Parmi les différentes méthodes d'analyse proposées pour la détermination du lactate, les biocapteurs offrent de nombreux avantages tels que la rapidité, la haute spécificité, le coût relativement faible et la possibilité de miniaturisation¹⁰. Les enzymes, telles que la L et/ou la D-lactate déshydrogénase (L-LDH et/ou de D-LDH)¹⁰⁻¹³, la L-lactate oxydase de *Pediococcus sp.* (LODP)^{4, 10, 14-20}, la LODP combinée à la peroxydase de raifort (HRP)^{3, 10, 21-25} ou à la D-LDH et la HRP²⁶ ont été proposées comme éléments de reconnaissance dans des biocapteurs électrochimiques pour les analyses de lactate. La LODP et l'ampérométrie sont l'enzyme et le mode de transduction les plus couramment utilisés. Les deux enzymes, LDH et LODP, catalysent l'oxydation du lactate en pyruvate (Eq.III.1 à

III.3) et la LODP, comme la L-LDH, ont été décrites comme des enzymes spécifiques au L-lactate. En outre, la LODP possède son propre coenzyme interne (flavine adénine dinucléotide, FAD) et utilise l'oxygène dissous comme accepteur d'électrons, tandis que l'action de la LDH nécessite l'ajout du coenzyme nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+). Les biocapteurs ampérométriques utilisant la LODP présentent l'inconvénient de devoir opérer à un potentiel élevé pour réaliser la détection du peroxyde d'hydrogène issu de la réaction enzymatique¹⁰. De plus, l'accumulation de H_2O_2 à l'intérieur de la membrane enzymatique peut réduire l'activité de la LODP. L'association de la LODP à la HRP a donc été proposée, comme dans le cas de l'AOX, pour résoudre ce problème.



Il a été montré que la HRP est également en mesure de coopérer avec d'autres oxydases telles que la glucose oxydase, provoquant l'amplification du signal de biocapteur²⁷.

En ce qui concerne l'immobilisation des enzymes, différentes techniques ont été utilisées, notamment l'adsorption directe ou la liaison de manière covalente à l'électrode¹⁶, la réticulation avec le GA^{4, 14, 15}, le piégeage dans des matrices sol-gel à base de silice^{17, 19} ou dans des polymères électropolymérisés¹⁸, la rétention sous une membrane de confinement²⁰ ou l'inclusion directe dans des électrodes à base de carbone^{21, 23-25}. Parmi ces techniques, la réticulation avec le GA est l'une des méthodes les plus simples et produit des biocapteurs de très bonne stabilité.

Dans ce travail, nous proposons une méthode originale combinant deux biocapteurs conductimétriques pour la détermination du L- et du D-lactate. Les biocapteurs ont été préparés par réticulation de la LODP seule ou de la LODP (couche externe) et la HRP (couche interne) sur la surface de micro-électrodes interdigitées d'or en utilisant les vapeurs de GA. Comme pour le biocapteur précédent, différents paramètres affectant la sensibilité du biocapteur bi-enzymatique LODP/HRP (rapport de LODP/HRP, pH, et temps de la réaction de réticulation, ...) ont d'abord été optimisés. Ensuite, une méthode a été proposée pour la quantification de la concentration en lactate total, ainsi que des concentrations en D- et en L-lactate dans des échantillons inconnus. Cette méthode

a été ensuite appliquée à l'analyse d'échantillons de yaourts et les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec des kits enzymatiques commerciaux.

III.2 Matériel et méthodes

III.2.1 Réactifs et solutions

Comme précédemment, toutes les solutions aqueuses ont été préparées avec de l'eau ultra-pure (résistivité > 18 MΩ.cm) obtenue à partir d'un système de purification MilliQ. La lactate oxydase (LODP, CE 1.1.3.2, 20 U.mg⁻¹ solide, extraite de *Pediococcus.sp*), la peroxydase de raifort (HRP, EC1.11.1.9, 188 U.mg⁻¹ solide), albumine de sérum bovin (BSA), le glutaraldéhyde (GA) (grade II, 25 % de solution aqueuse), KH₂PO₄ (> 99 %), K₂HPO₄ (98 %), l'acide L(+)-lactique (90 %), l'acide D(+)-lactique (97,74 %), le D (+) glucose (réactif ACS), l'acide L(+)-ascorbique (99 %), le D(-)-fructose (99 %), le 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS, > 98 %) et le Nafion (5 % en masse dans un mélange d'alcools aliphatiques et d'eau contenant 15-20 % H₂O) ont été fournis par Sigma-Aldrich. Le glycérol (> 99 %) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, 30 %) ont été achetés respectivement chez Acros Organics et chez Fluka. Les kits commerciaux de dosage de l'acide D-et L-lactique sont produits par R-Biopharm, GmbH, Allemagne. Les solutions mères d'acide D-et L-lactique ainsi que des substances des tests d'interférence ont été préparées dans du tampon phosphate 5 mM (pH 7) et conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation. Les mélanges LODP/BSA/glycérol ainsi que BSA/glycérol ont été conservés à -20°C entre deux utilisations, tandis que le mélange HRP/BSA/glycérol a été gardé à 4°C.

III.2.2 Préparation des biocapteurs

Les transducteurs utilisés dans ce travail sont ceux de l'IPSL. La première paire d'électrodes, sur laquelle est déposée une membrane enzymatique contenant la LODP seule ou la LODP et la HRP, constitue l'électrode de travail. La seconde, recouverte par une membrane de BSA non réactive, est l'électrode de référence.

Les électrodes sont prétraitées comme décrit dans le chapitre précédent (§II.2.3). Ensuite, 0,3 µl d'une solution de tampon phosphate 20 mM pH 7 contenant 5 % (m/v) de BSA, 10 % (m/v) de glycérol et 5 % (m/v) HRP sont déposés sur la paire d'électrodes de travail, tandis que 0,3 µl d'un mélange contenant 10 % (m/v) de BSA et 10 % (m/v) de glycérol sont déposés sur les électrodes de référence. Le capteur est laissé sécher pendant 20 min à température ambiante. Puis, une deuxième couche est

déposée sur chaque électrode, suivant le même protocole, sauf que la HRP est remplacée par la LODP dans la solution enzymatique (Fig.III.2). La même procédure a été utilisée pour préparer des biocapteurs à LODP sauf qu'une seule couche contenant la LODP a été déposée sur la zone sensible de l'électrode de travail. Après le dépôt des solutions d'enzymes et de BSA, le capteur est placé dans une atmosphère saturée de vapeur de GA. Le reste du protocole est identique à celui utilisé pour l'élaboration du biocapteur à AOX (§II.2.4).

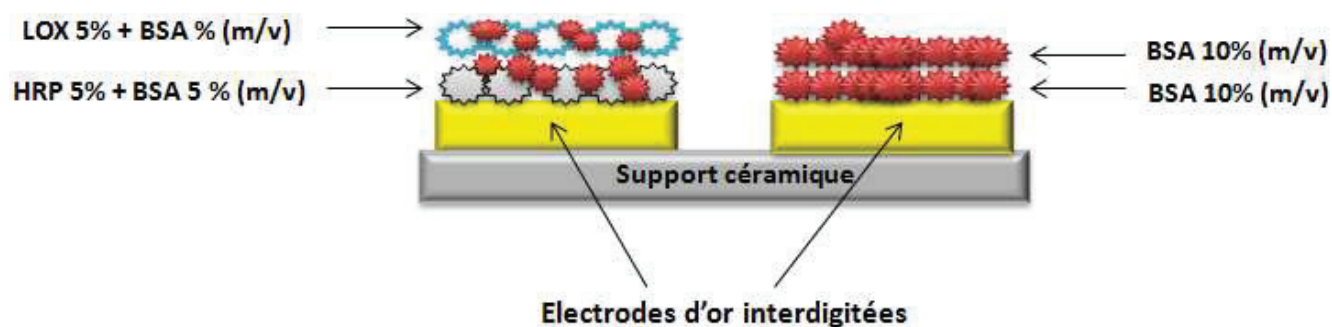


Fig.III.2: Constitution du biocapteur LODP / HRP.

III.2.3 Mesures conductimétriques

Toutes les mesures sont effectuées à température ambiante dans une solution tampon phosphate 5 mM pH 6 en utilisant le dispositif expérimental et l'instrumentation décrite dans le chapitre II . La différence de conductance entre l'électrode de travail et de référence a été suivie et enregistrée jusqu'à ce qu'une valeur stable soit atteinte. Puis, de petits volumes (5 à 50 μ L) d'une solution concentrée d'acide L-ou D-lactique ont été ajoutés pour obtenir les concentrations finales appropriées.

II.2.4. Mesure spectrophotométrique de la sélectivité de la LODP vis-à-vis du L-lactate

Cette méthode est basée sur la détection spectrophotométrique de H_2O_2 produit lors de l'oxydation du lactate par la LODP. H_2O_2 réagit avec l'ABTS en présence de HRP pour former la forme oxydée de l'ABTS, un composé de couleur verte absorbant à 405 nm (Eq. III.5).



Les expériences sont réalisées dans des cuves en polystyrène de 1 mL. 0,1 mL d'une solution de 1 mM d'ABTS préparée dans du tampon phosphate 20 mM pH 6,5, 0,02 mL d'une solution de HRP

(50 U/mL) et différents volumes (0; 5; 10; 15 et 25 μ L) d'une solution à 2 mM d'acide L- ou D-lactique sont introduits dans les cuves et le volume est complété à 1 mL à l'aide de tampon phosphate 20 mM pH 6,5. Les cuves sont agitées manuellement et l'absorbance est mesurée à 405 nm jusqu'à stabilisation du signal (absorbance correspondante: A_0). Ensuite, 4 μ L d'une solution de LODP (2000 U/mL) sont ajoutés et les cuves sont incubées à 25°C pendant 30 min (absorbance : A_1). Les différences d'absorbance (A_1-A_0) sont alors portées en fonction de la concentration en L- ou D-lactate.

III.2.5 Préparation et analyse des échantillons de yaourt

Les yaourts au lait de vache de la société Danone ont été achetés dans un supermarché local et dilués dans du tampon phosphate 5 mM pH 6 de manière à obtenir une solution à 300 g.L⁻¹. Ensuite, chaque échantillon a été analysé en duplicat en utilisant les deux biocapteurs conductimétriques LODP et LODP/HRP (volume injecté: 20 μ L). Tous les échantillons ont été analysés en utilisant également un kit disponible dans le commerce pour la détermination du L- et du D-lactate dans les denrées alimentaires en suivant les instructions du fabricant.

III.3. Résultats et discussion

III.3.1 Influence de la quantité de HRP et du pH sur la détection du L-lactate

III.3.1.1 Quantité de HRP

Dans une première série d'expériences, nous avons étudié l'influence de la quantité de HRP sur la réponse du biocapteur suite à l'injection du L-lactate. Le pH de mesure a été fixé à 6. Compte tenu des résultats obtenus dans le chapitre précédent, la quantité de LODP dans la solution membranaire a été fixée à 5 % (m/v), soit 0,015 mg de solide (activité théorique: 0,3 U) tandis que la concentration de HRP était de 5 ou 15 % (m/v), correspondant à 0,015 ou 0,045 mg d'enzyme (activités théoriques: 3U et 9 U).

Comme on peut le voir sur la figure III.3, l'injection de L-lactate dans la cellule de mesure contenant le biocapteur à LODP seule provoque une augmentation rapide et significative de la conductance. Cette variation peut être en partie liée à la différence entre la conductivité molaire ionique du lactate et du pyruvate. Cependant, une autre explication plus probable est que la conformation de la LODP change lors de l'étape de réticulation et entraîne une augmentation de la stabilité du complexe enzyme-pyruvate, favorisant un autre mécanisme au cours duquel sont produits

des ions acétates et du CO_2 avec comme intermédiaire le complexe LODP-pyruvate- H_2O_2 (Fig.III.4, voie 1). La dissolution du CO_2 dans le tampon génère des ions H^+ et HCO_3^- , à l'origine de l'augmentation significative de conductance observée. Comme nous l'avons déjà mentionné dans la partie bibliographique (§I.3.6.3), ce deuxième mécanisme est classiquement rapporté pour les L-lactate monooxygénases mais pas pour les L-lactate oxydases²⁸. Dans la voie 2, le complexe est peu stable ce qui entraîne la transformation rapide du lactate en pyruvate et H_2O_2 grâce à l'oxygène dissous tandis que dans la première voie, la stabilité du complexe formé est plus élevée et la réaction d'oxydation en présence de H_2O_2 , agent oxydant fort, peut avoir lieu conduisant à la production de CH_3COO^- , CO_2 et H_2O .

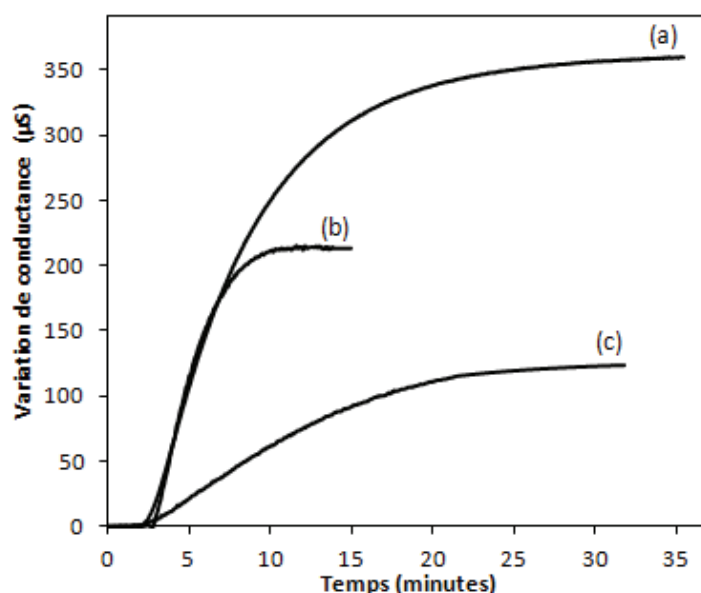


Fig.III.3: Influence de la quantité de HRP sur la réponse du biocapteur.

(a) LODP 5 %, HRP 5 % - (b) LODP 5 % - (c) LODP 5 %, HRP 15 %

Injection d'une solution de 100 μM de L-lactate. Mesures réalisées dans 5 mM de tampon phosphate pH 6.

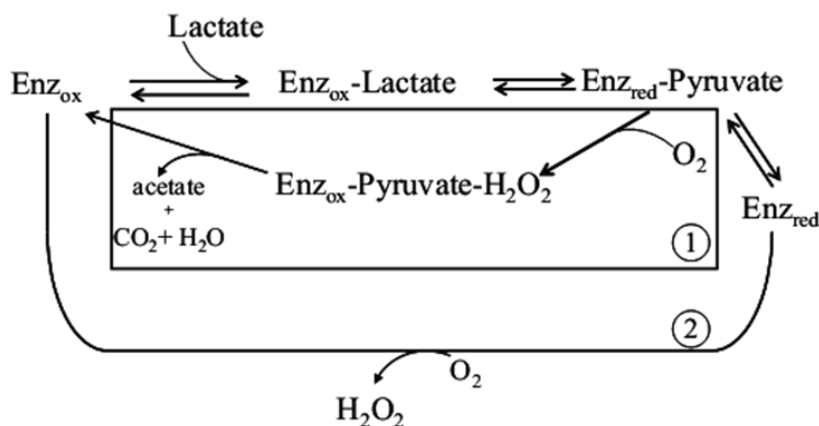
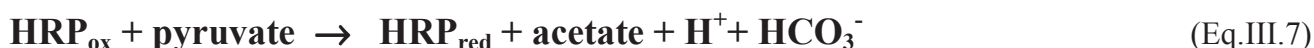


Fig.III.4: Mécanismes d'oxydation enzymatique du L-lactate par la L-lactate oxydase (voie 1) et la L-lactate monooxygénase (voie 2)²⁸

L'ajout de 5 % (m/v) de HRP multiplie par 1,7 le signal à l'équilibre du biocapteur, mais augmente également le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre (Fig. III.3). Le bruit de fond est en même temps divisé par 1,5, entraînant une amélioration nette du rapport signal sur bruit, donc de la limite de détection. Comme signalé précédemment, la HRP est une peroxydase qui catalyse l'oxydation de nombreux substrats réducteurs en utilisant H_2O_2 comme agent oxydant. L'amélioration des signaux par ajout de la HRP pourrait dans ce cas être attribuée à l'existence du mécanisme supplémentaire suivant (Eq.III.6 et III.7), le pyruvate agissant comme un substrat de la HRP; HRP_{Ox} et HRP_{Red} étant les formes oxydées et réduites de la HRP, respectivement.



L'ajout d'une quantité de HRP de 15 % (m/v) provoque par contre une forte diminution du signal (Fig.III.3) alors que celui-ci avait été multiplié par 2, pour le biocapteur à AOX (Fig.II.15). Le bruit de fond double par ailleurs lorsque la concentration en HRP passe de 5 à 15 %. C'est probablement dû à la trop grande quantité d'enzyme sur la surface d'électrode, ce qui peut provoquer les problèmes de diffusion ou le changement de la conformation de LOX. Compte tenu de ces résultats, la concentration de 5 % (m/v) de HRP a été retenue dans la suite de ce travail.

III.3.1.2 pH du milieu

Les variations de conductance à l'équilibre ont ensuite été enregistrées pour une concentration en L-lactate de 100 μM en faisant varier le pH entre 4,5 et 8,5. Les résultats obtenus en absence et en présence de HRP ont été comparés. Ainsi que le montre la figure III.5, la valeur de pH optimale pour le fonctionnement du biocapteur est proche de 6, en absence aussi bien qu'en présence de HRP. La courbe en cloche obtenue avec la LODP seule est très similaire à celle rapportée par Sullivan pour la lactate oxydase libre extraite de *Mycobacterium smegmatis* ²⁹. Ce résultat est également compatible avec les valeurs optimales déclarées pour la LODP immobilisée en utilisant divers procédés, y compris la réticulation ^{4, 15, 17, 18}. La zone optimale de pH est beaucoup plus étroite en présence qu'en l'absence

de HRP, ce qui peut être attribué à une plus grande sensibilité de la HRP vis-à-vis des variations de pH.

Compte tenu des résultats de ces deux séries d'expériences, la coopération optimale pour les deux enzymes LODP et HRP est obtenue pour un rapport de masse HRP/LODP de 1 (taux d'activité théorique HRP/LODP de 10 U), en bon accord avec le rapport optimal trouvé par Monosik *et al.*³. Sur la base de ces résultats, les expériences ultérieures ont été réalisées en tampon phosphate pH 6 et les biocapteurs ont été préparés en utilisant des solutions enzymatiques contenant 5 % de HRP et 5 % de LODP.

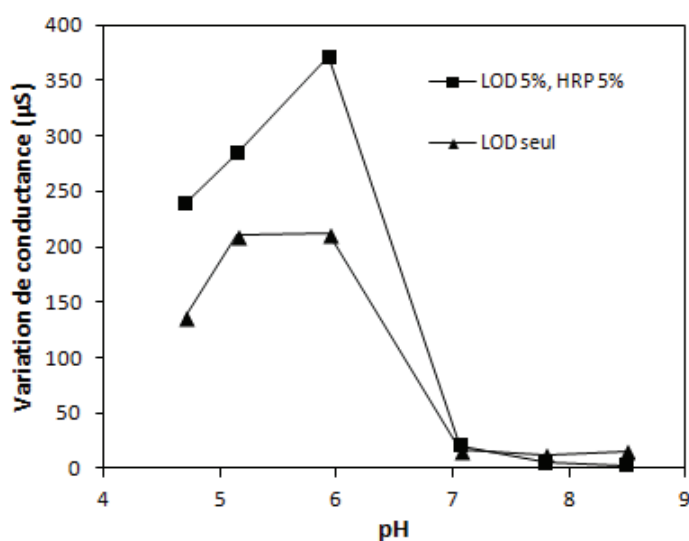


Fig.III.5: Influence du pH sur la variation de conductance à l'équilibre du biocapteur à LODP seule (▲) ou à LODP/HRP (■)
Mesures effectuées à l'aide d'une solution 100 µM de L-lactate dans du tampon phosphate 5 mM

III.3.2 Influence du temps de réticulation sur la réponse du biocapteur bi-enzymatique LODP/HRP

Dans cette étude, dix biocapteurs LODP/HRP ont été préparés en utilisant des temps de réticulation de 10 min (n = 2), 20 min (n = 3), 30 min (n = 3) ou 40 min (n = 2).

Comme on le voit sur la figure III.6, la variation de conductance à l'équilibre après injection de 100 µM de L-lactate augmente avec le temps de réticulation pour atteindre un maximum à 30 minutes. Une baisse d'intensité du signal est observée au-delà de cette valeur. Cependant, comme nous le montrerons dans le paragraphe suivant, une meilleure stabilité dans le temps est atteinte pour 40 min

de réticulation. Afin d'obtenir le meilleur compromis entre la stabilité et la sensibilité du biocapteur, nous avons décidé de choisir la valeur de 40 min pour la suite des expériences.

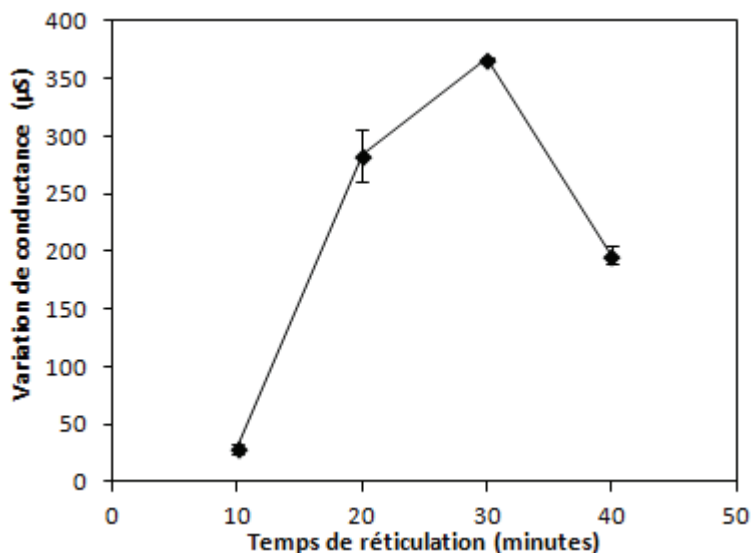


Fig.III.6: Influence du temps de réticulation sur l'intensité du signal du biocapteurs bi-enzymatique LODP/HRP. Mesures effectuées à l'aide d'une solution de 100 μ M de L-lactate dans du tampon phosphate 5 mM

III.3.3 Réponse des biocapteurs LODP et LODP/HRP vis-à-vis du D-lactate

Ainsi qu'il a été mentionné dans l'introduction, la LODP appartient à la famille des enzymes flavine mononucléotide-dépendantes et α -hydroxy-acide oxydantes. Cette flavoprotéine devrait être capable de discriminer les configurations L/D du lactate, le L-lactate étant considéré comme un substrat actif alors que le D-lactate est inactif^{30, 31}. Cependant, aucun des biocapteurs développés pour la détermination du lactate n'a été testé en présence des deux substrats et ces biocapteurs sont toujours présentés comme des biocapteurs à L-lactate. Le D-lactate peut pourtant être dans certains cas présent à des concentrations élevées dans les liquides biologiques et les produits alimentaires.

Dans ce travail, nous avons d'abord contrôlé à l'aide d'un dosage enzymatique, que l'enzyme utilisée était bien capable de catalyser sélectivement l'oxydation du L-lactate lorsqu'elle est en solution. Comme prévu (Fig.III.7), la réponse de l'enzyme vis-à-vis du D-lactate ne représente que 3 % de celle vis-à-vis du L-lactate au même niveau de concentration.

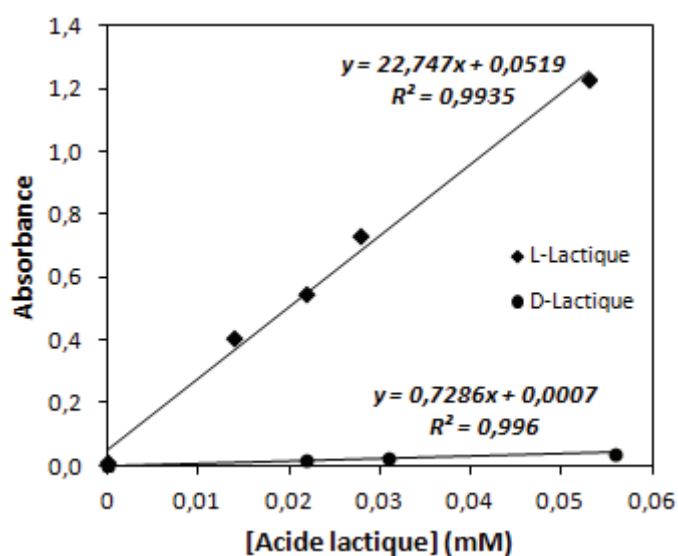


Fig.III.7: Mesure de la sélectivité de catalyse de la LODP vis-à-vis du L- (◆) et du D- (●) lactate par spectrophotométrie.

Cependant, contrairement à notre attente, les biocapteurs à LODP avec ou sans la présence de HRP fournissent des réponses importantes quand le D-lactate est ajouté dans le milieu. Les signaux à l'équilibre obtenus pour les deux stéréoisomères sont quasiment identiques pour le biocapteur sans HRP, tandis que le signal est plus élevé pour le D-lactate que pour le L-lactate dans le cas du biocapteur bi-enzymatique LODP/HRP (Fig.III.8). Le premier résultat peut être attribué à une perte de sélectivité chirale de la LODP, ce qui confirme l'hypothèse de changement de conformation de l'enzyme au cours de l'étape d'immobilisation déjà émise dans le chapitre précédent. En outre, Kataki et Zawawi ³² ont récemment rapporté dans leur travail l'inversion de la sélectivité chirale de la LODP immobilisée dans du collagène. Ils expliquent ce résultat par les interactions électrostatiques entre la LODP (pI = 4,6) et le collagène (pI = 8,26). D'une façon très similaire, la valeur de pI de la HRP étant de 8,8 ³³, la charge globale de la HRP est positive à pH 7, alors qu'elle est négative pour la LODP au même pH. La sélectivité chirale de notre enzyme peut donc être aussi inversée au contact de la HRP, ce qui permet d'expliquer l'augmentation de la réponse du biocapteur LODP/HRP vis-à-vis du D-lactate.

Ce résultat, au premier abord surprenant, est en fait très intéressant car il peut être exploité pour la quantification de la concentration en lactate total ainsi que de celle de D-et L-lactate en utilisant une combinaison des réponses des biocapteurs LODP seul et LODP/HRP, comme nous le verrons dans le §.3.6.

III.3.4 Caractéristiques analytiques des biocapteurs LODP et LODP/HRP

III.3.4.1 Gamme linéaire et limite de détection

Les figures III.8a et III.8b ont été construites à partir de l'analyse d'au moins douze solutions standards (D-ou L-lactate) et trois mesures ont été effectuées à chaque niveau de concentration.

Ainsi que le montre la figure III.8a, la réponse de biocapteur à LODP est linéaire jusqu'à 100 μM de L-lactate. Le domaine linéaire double en présence de HRP. La sensibilité du biocapteur est de $1,16 \pm 0,04 \mu\text{S}.\mu\text{M}^{-1}$ et $4,38 \pm 0,10 \mu\text{S}.\mu\text{M}^{-1}$ en l'absence et en présence de HRP, respectivement, ce qui confirme le rôle positif joué par la HRP. La meilleure limite de détection (0,05 μM) est donc obtenue avec le capteur bi-enzymatique. C'est huit fois mieux que sans HRP, et de loin beaucoup mieux que les valeurs rapportées dans la littérature pour la plupart des autres biocapteurs basés sur la LODP ou une combinaison LODP/HRP (Tableau.III.2). De la même façon, la sensibilité du biocapteur vis-à-vis du D-lactate est de $1,160 \pm 0,054 \mu\text{S}.\mu\text{M}^{-1}$ et $5,58 \pm 0,20 \mu\text{S}.\mu\text{M}^{-1}$ en absence et en présence de HRP, avec une limite de détection de 0,05 μM pour le biocapteur LODP/HRP.

III.3.4.2 Reproductibilité intra-capteur à court terme

Les coefficients de variation obtenus à partir de trois mesures de L-ou D-lactate effectuées à chaque concentration avec les capteurs décrits précédemment sont très bons car ils se situent entre 1 % et 8 % dans la gamme de concentration étudiée.

III.3.4.3 Stabilité

Les stabilités de stockage à long terme des biocapteurs basés sur la LODP et la combinaison LODP/HRP ont été également comparées. Un biocapteur de chaque type a été fabriqué dans les conditions optimales déterminées précédemment et deux autres capteurs LODP/HRP ont été préparés de la même manière, sauf que le temps de réaction avec les vapeurs de GA étaient de 20 min et 40 min, respectivement. Tous les biocapteurs ont été mesurés à plusieurs reprises sur une période de 5 semaines pour une solution 100 μM de L-lactate. Pendant ce temps, les biocapteurs étaient conservés à 4°C dans le tampon phosphate 20 mM pH 7.

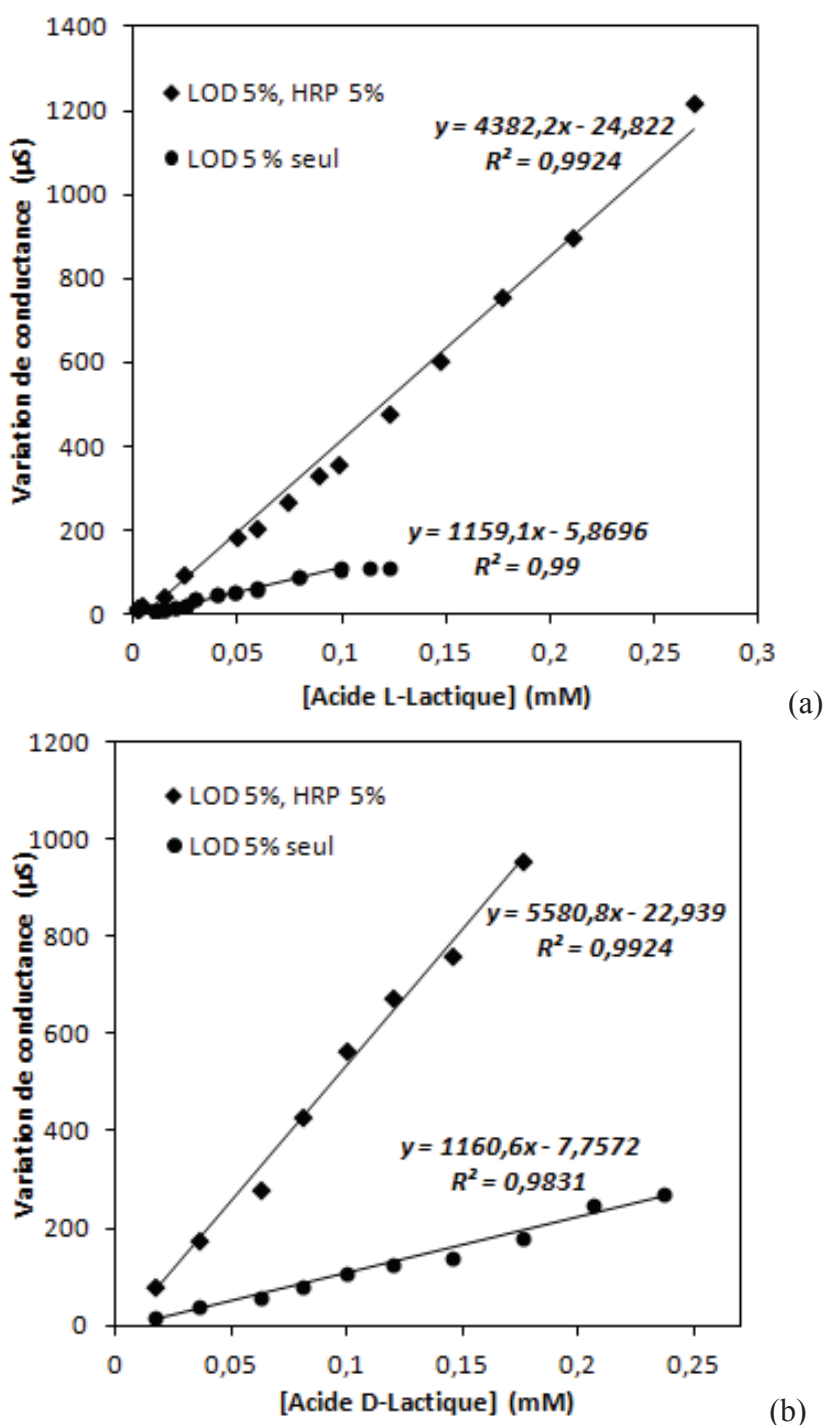


Fig.III.8: Influence de la concentration en L-lactate (a) et D-lactate (b) sur la réponse des biocapteurs LODP et LODP/HRP. Les mesures ont été réalisées dans 5 mM de tampon phosphate pH 6.

Comme on le voit sur la Fig.III.9, le biocapteur bi-enzymatique LODP/HRP exposé à la vapeur de GA pendant 40 min est le plus stable sur toute la période testée. Le biocapteur LODP/HRP présente également une plus grande stabilité que le biocapteur construit uniquement à partir de LODP (données

non présentées), ce qui confirme l'effet protecteur de la HRP à l'égard des effets nocifs de H_2O_2 envers l'enzyme.

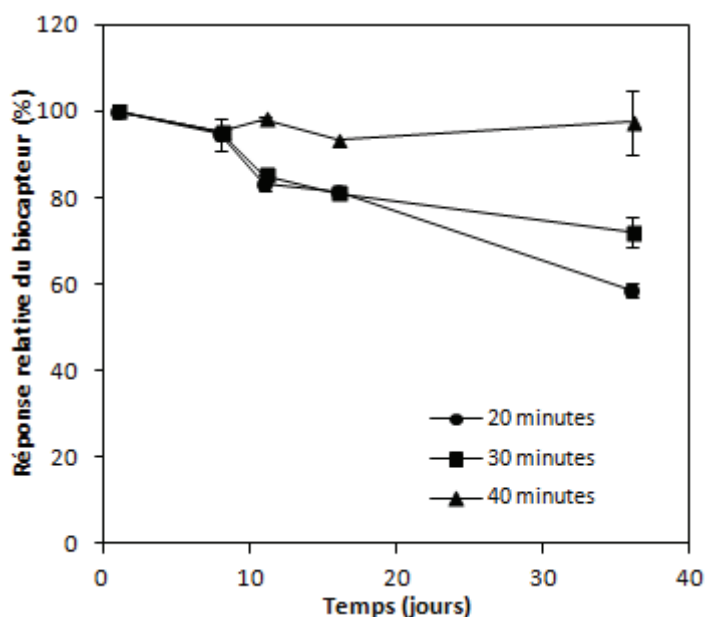


Fig.III.9: Influence du temps de réticulation sur la stabilité au stockage du biocapteur LODP/HRP
100 μ M de L-lactate dans 5 mM de tampon phosphate pH 6.
Biocapteurs conservés à 4°C dans 20 mM de tampon phosphate pH 7 entre deux mesures.

III.3.4.4 Sélectivité

Nous avons ensuite réalisé une étude d'interférence avec des composés susceptibles d'être présents dans des échantillons de yaourt (glucose, lactose et acide ascorbique) ou de jus de fruits (fructose). L'étude a été réalisée en utilisant le biocapteur LODP/HRP, pour une concentration de L-lactate de 100 μ M et pour des rapports molaires L-lactate/interfèrent de 1:1 ou 1:0,1.

Comme le montre la Fig.III.10, aucune des substances évaluées, sauf l'acide ascorbique, n'affecte de manière significative le signal du biocapteur. Une augmentation de 70 % du signal a été observée pour un rapport lactate/ascorbate de 1, et de 38 % pour un rapport de 10. Ce résultat peut provenir d'une oxydation de ce composé par H_2O_2 , soit chimique, soit enzymatique, en utilisant la HRP comme catalyseur. Néanmoins, ceci ne peut affecter la justesse de détermination du L-lactate dans le yaourt puisque la concentration d'acide ascorbique est environ 500 fois plus faible que celle de l'acide L-lactique dans ce type d'échantillon²¹.

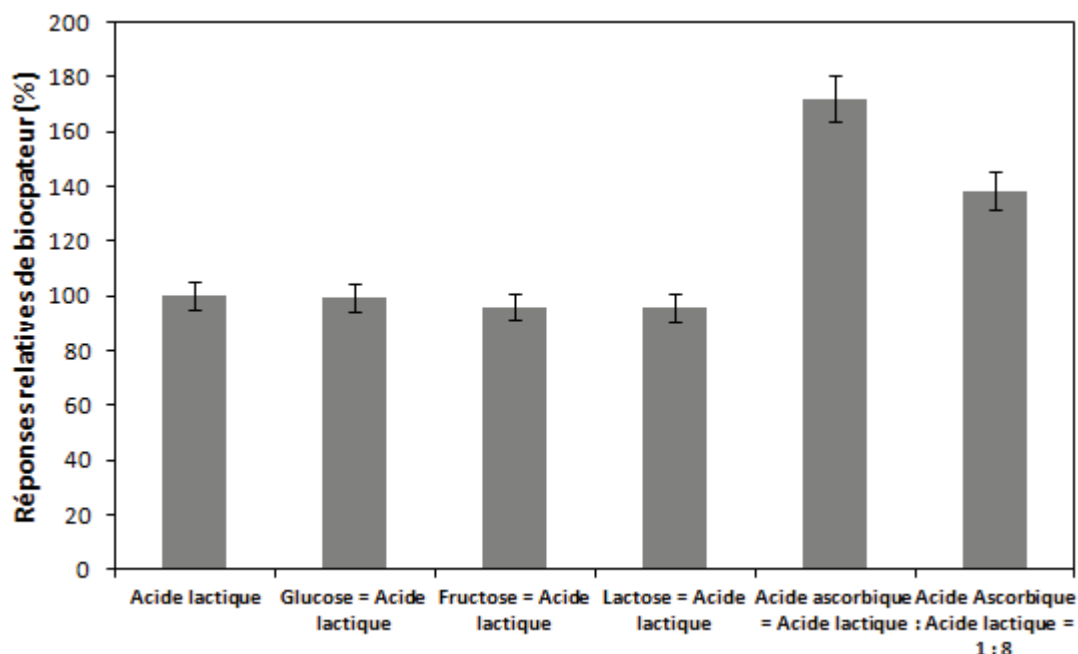


Fig.III.10: Comparaison des réponses du biocapteur LODP/HRP obtenues pour le L-lactate en présence d'éventuelles substances interférentes. [L-lactate] = 100 μ M dans 5 mM de tampon phosphate pH 6.

III.3.5 Effet de matrice

Afin de détecter l'existence d'un possible effet de matrice, deux échantillons de yaourt (yaourt nature et Activia) ont été dilués dans un tampon phosphate comme décrit dans la section III.2.6. De petits volumes d'une solution mère d'acide D- ou L-lactique ont été ajoutés à un volume constant d'échantillon afin d'obtenir des concentrations finales dans la plage de 20-160 μ M. Ensuite, les solutions ont été analysées en utilisant le biocapteur LODP et le biocapteur bi-enzymatique LODP/HRP. L'effet de matrice a été évalué en comparant la pente de la courbe d'étalonnage dans la matrice à celle de la courbe d'étalonnage dans le tampon phosphate. Toutes les courbes obtenues sont linéaires mais les pentes sont de 16 à 33 % plus élevées dans la matrice selon l'échantillon et le biocapteur (données non présentées). Ce résultat peut être attribué à la présence dans les échantillons de composés capables de stabiliser le complexe LODP-pyruvate, favorisant l'oxydation du pyruvate.

Il a donc été décidé d'effectuer l'étalonnage dans la matrice pour l'analyse des échantillons réels.

Chapitre III: Développement d'un biocapteur conductimétrique sensible pour la détermination de la concentration en lactate total, D et L-lactate dans les produits laitiers

<i>Méthode de transduction</i>	<i>Electrodes Techniques d'immobilisation</i>	<i>Gamme linéaire (μM)</i>	<i>LD (μM)</i>	<i>Echantillons</i>	<i>Ref</i>
LODP seul					
Conductimétrique	Interdigitées en or Réticulation par la vapeur de GA	Jusqu'à 100	0,4	Yaourts	ce travail
QCM	Disque en or (non modifié/ modifié par DTSP)				
	Adsorption Liaison covalente	Jusqu'à 300 Jusqu'à 200	10 40	Vins, bières	16
Ampérométrie	Pt sérigraphié/PPy				
	Réticulation avec GA en solution	Jusqu'à 1000	~2	Lait	14
	Disque de Pt /Nafion				
	Réticulation avec GA/sandwich avec polycarbonate	2 -2000	0,8	Sang	4
	Carbone graphite/MWCNT				
	Incorporation dans de la silice sol-gel	200 - 2000	0,8	Sérum humain	17
	Carbone graphite				
	Incorporation dans un composite laponite/oligosésquioxane	3 - 300	1	Yaourts Lait fermenté Vin	19

Chapitre III: Développement d'un biocapteur conductimétrique sensible pour la détermination de la concentration en lactate total, D et L-lactate dans les produits laitiers

LOD/HRP					
Conductimétrique	Interdigitées en or				
	Réticulation par la vapeur de GA				
Ampérométrie	Sérigraphiée				
	Graphite/Acétate de cellulose				
	Carbone graphite				
	PEG/polyallyamine/OsPAA				
	Carbone graphite/Teflon®				
	Or/MWCNT				
	En mode sandwich avec le chitosane				
Chimioluminescence	Membrane polyanions				

PPy: polypyrrolle; DTSP: acide 3,3'-dithiodipropionique di(*N*-succinimidyl ester); PEG : Poly(ethylene glycol)diglycidyl éther; OsPAA: polymère électroactif à base d'osmium;MWCNT: nanotubes de carbone multi-feuillets

Tableau III.2 : Performances analytiques de quelques biocapteurs à base de LODP ou LODP/HRP pour l'analyse du lactate dans les aliments

III.3.6 Détermination des concentrations en lactate total, D-et L-lactate dans les échantillons de yaourts

Les deux biocapteurs LODP et LODP/HRP ont ensuite été utilisés pour la détermination de la concentration en lactate total, en D- et en L-lactate dans trois échantillons de yaourt.

Une dilution préalable des échantillons a été effectuée dans le tampon phosphate 5 mM pH 6 afin de limiter les effets de matrice, se trouver dans la gamme linéaire des biocapteurs, et tamponner de manière appropriée la solution au pH optimal de mesure. Les échantillons ont ensuite été dopés à différentes concentrations de L- ou de D-lactate et les pentes des droites d'ajouts dans la matrice ont été calculées pour les biocapteurs LODP et LODP/HRP.

Toutes les mesures ont été effectuées le même jour, de manière à ce que la stabilité inter-jour n'ait pas d'incidence sur les résultats. Tous les échantillons ont été analysés en utilisant les biocapteurs LODP et LODP/HRP. La concentration totale en lactate est directement déduite des réponses du biocapteur LODP, tandis que les concentrations en D-et en L-lactate sont calculées en combinant toutes les réponses, comme proposé ci-après.

III.3.6.1 Calcul de la concentration totale en lactate

La réponse des biocapteurs à LODP vis-à-vis du D-et du L-lactate étant identiques, il est possible de construire une courbe d'étalonnage unique à partir de toutes les données des ajouts dosés enregistrées pour le D-et le L-lactate et de l'utiliser pour calculer la concentration totale de lactate dans l'échantillon par la formule suivante:

$$G_{T,LODP} = G_{L,LODP} + G_{D,LODP} = S([L - \text{lactate}] + [D - \text{lactate}]) + 2B \quad (\text{Eq.III.8})$$

où $G_{T, LODP}$ est la variation de conductance totale mesurée sur l'échantillon, S et B sont la pente et l'intersection de la courbe d'étalonnage avec l'axe des abscisses

III.3.6.2 Calcul des concentrations en D-et L-lactate

Si $S_{L,LODP}$, $S_{L,LODP/HRP}$, $S_{D,LODP}$ et $S_{D,LODP/HRP}$ représentent les pentes des courbes d'ajouts en L- et D-lactate obtenues en l'absence et en présence de HRP, on peut en déduire les rapports:

$$R_L = \frac{S_{L,LODP/HRP}}{S_{L,LODP}} = \frac{G_{L,LODP/HRP}}{G_{L,LODP}} \quad (\text{Eq.III.9})$$

$$R_D = \frac{S_{D,LODP/HRP}}{S_{D,LODP}} = \frac{G_{D,LODP/HRP}}{G_{D,LODP}} \quad (\text{Eq.III.10})$$

où $G_{L,LODP/HRP}$ et $G_{D,LODP/HRP}$ sont les contributions respectives du L-et du D-lactate aux variations totales de la conductance, $G_{T,LODP}$ et $G_{T,LODP/HRP}$ sont celles mesurées sur l'échantillon en utilisant les biocapteurs LODP et LODP/HRP, respectivement.

$G_{T,LODP/HRP}$ est également reliée à $G_{L,LODP/HRP}$ et $G_{D,LODP/HRP}$ par l'équation suivante:

$$G_{T,LODP/HRP} = G_{L,LODP/HRP} + G_{D,LODP/HRP} = R_L G_{L,LODP/HRP} + R_D G_{D,LODP/HRP} \quad (\text{Eq.III.11})$$

Ainsi, on peut déduire des Eq.III.8 et Eq.III.11, les valeurs de $G_{L,LODP}$ et $G_{D,LODP}$ par:

$$G_{L,LODP} = \frac{(G_{T,LODP/HRP} - R_D G_{T,LODP})}{(R_L - R_D)} \quad (\text{Eq.III.12})$$

$$G_{D,LODP} = \frac{(R_L G_{T,LODP} - G_{T,LODP/HRP})}{(R_L - R_D)} \quad (\text{Eq.III.13})$$

Les concentrations en L-et D-lactate peuvent ensuite être calculées à partir des courbes d'ajouts du biocapteur à LODP.

III.3.6.3 Résultats

Le tableau III.3 montre que les concentrations mesurées dans les échantillons de yaourt en utilisant la méthode proposée ci-dessus sont en bon accord avec celles obtenues avec la méthode de référence (kit commercial). Dans ces échantillons, la forme de lactate prédominante est le L-lactate.

Produit	Lactate total	L-Lactate			D-Lactate		
	<i>Cette méthode g/100g</i>	<i>Kit</i>	<i>Cette méthode g/100g</i>	<i>Recouvrement %</i>	<i>Kit</i>	<i>Cette méthode g/100g</i>	<i>Recouvrement %</i>
Yaourt							
<i>nature</i>	0,65	0,63	0,68	108	0,054	0,045	83
<i>Activa</i>	0,43	0,45	0,41	91	0,035	0,04	114
<i>Actimel</i>	0,72	0,74	0,69	93	0,04	0,035	87,5

Tableau.III.3 : Comparaison des teneurs en D-et L-lactate déterminées dans des échantillons de yaourt.par notre méthode et une méthode de référence (kit enzymatique commercial)

III.4. Conclusion

Dans cette partie du travail, nous avons développé une méthode originale et sensible combinant deux microbiocapteurs conductimétriques à base d'enzymes (LODP et HRP) pour la détermination de la concentration en lactate total, L-et D-lactate dans les produits laitiers. La procédure expérimentale ne nécessite que la dilution des échantillons et prend très peu de temps par rapport aux techniques classiques. Une limite de détection très basse de 0,05 μM a été obtenue pour les deux isomères. La réponse du biocapteur LODP/HRP est linéaire jusqu'à au moins 210 μM pour les deux composés. Le biocapteur a par ailleurs été appliqué avec succès à la quantification du lactate total, du L et du D-lactate dans des échantillons de yaourt, ce qui démontre le grand potentiel de la méthode proposée pour des applications pratiques dans l'analyse des aliments.

Références

1. Narayanan, N.; Roychoudhury, P.K.; Srivastava, A., L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization *Electron. J. Biotechnol.* **2004**, 7, 167-179.
2. Shapiro, F.; Silanikove, N., Rapid and accurate determination of D- and L-lactate, lactose and galactose by enzymatic reactions coupled to formation of a fluorochromophore: Applications in food quality control. *Food Chem.* **2010**, 119, 829-833.
3. Monosík, R.; Stredanský, M.; Greif, G.; Sturdík, E., A rapid method for determination of L-lactic acid in real samples by amperometric biosensor utilizing nanocomposite. *Food Control* **2012**, 23, 238-244.
4. Romero, M.R.; Ahumada, F.; Garay, F. Baruzzi, A.M., Amperometric Biosensor for Direct Blood Lactate Detection. *Anal. Chem.* **2010**, 82, 5568-5572.
5. Lunt, J., Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers *Polym. Degrad. Stab.* **1998**, 59, 145-152.
6. Ministère de l'Economie, de l'Industrie et de l'Emploi, Spécification technique de l'achat public - Laits et produits laitiers. Juillet **2009**.
http://www.economie.gouv.fr/files/directions_services/daj/marches_publics/oeap/gem/produits_laitiers/produits_laitiers.pdf, accédé le 7 mai 2013
7. Commission Européenne, Règlement (UE) N° 1129/2011 modifiant l'annexe II du règlement (CE) n° 1333/2008 du Parlement européen et du Conseil en vue d'y inclure une liste de l'Union des additifs alimentaires *Journal officiel de l'Union européenne*, 11 novembre **2011**.
8. Oenofrance, Acide lactique. **2011**. <http://www.oenofrance.com/upload/produits/FT-AcideLactique-FR.pdf>, accédé le 7 mai 2013
9. Liu, S.-Q., Review article : Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, 83, 115-131.
10. Nikolaus, N.; Strehnitz, B., Amperometric lactate biosensors and their application in (sports) medicine, for life quality and wellbeing. *Microchim. Acta* **2008**, 160, 15-55.
11. Tsai, Y.-C.; Chen, S.-Y.; Liaw, H.-W., Immobilization of lactate dehydrogenase within multiwalled carbon nanotube-chitosan nanocomposite for application to lactate biosensors. *Sens. Actuators B* **2007**, 125, 474-481.
12. Agüi, L.; Eguilaz, M.; Pena-Farfal, C.; Yanez-Sedeno, P.; Pingarron, J.M., Lactate dehydrogenase biosensor based on an hybrid carbon nanotube-conducting polymer modified electrode. *Electroanalysis* **2009**, 21, 386-391.

13. Radoi, A.; Moscone, D.; Palleschi, G., Sensing the lactic acid in probiotic yogurts using an L-lactate biosensor coupled with a microdialysis fiber inserted in a flow analysis system. *Anal. Lett.* **2010**, 43, 1301-1309.
14. Palmisano, F.; Quinto, M.; Rizzi, R.; Zambonin, P.G., Flow injection analysis of L-lactate in milk and yoghurt by on-line microdialysis and amperometric detection at a disposable biosensor. *Analyst* **2001**, 126, 866-870.
15. Suman, S.; Singhal, R.; Sharma, A.L.; Malthotra, B.D.; Pundir, C.S., Development of a lactate biosensor based on conducting copolymer bound lactate oxidase. *Sens. Actuators B* **2005**, 107, 768-772.
16. Parra, A.; Casero, E.; Vazquez, L.; Pariente, F.; Lorenzo, E., Design and characterization of a lactate biosensor based on immobilized lactate oxidase onto gold surfaces. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 555, 308-315.
17. Huang, J.; Song, Z.; Li, J.; Yang, Y.; Shi, H.; Wu, B.; Anzai, J.-I.; Osa, T.; Chen, Q., A highly-sensitive L-lactate biosensor based on sol-gel film combined with multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) modified electrode. *Mater. Sci. Eng. C* **2007**, 27, 29-34.
18. Shkotova, L.V. Goriushkina, T.B.; Tran-Minh, C.; Chovelon, J.-M.; Soldatkin, A.P.; Dzyadevych S.V., Amperometric biosensor for lactate analysis in wine and must during fermentation. *Mater. Sci. Eng. C* **2008**, 28, 943-948.
19. Zanini, V.P.; Mishima, B.L.d.; Labbe, P.; Solis, V., An L-lactate amperometric enzyme electrode based on L-lactate oxidase immobilized in a laponite gel on a glassy carbon electrode. Application to dairy products and red wine. *Electroanalysis* **2010**, 22, 946-954.
20. Goran, J.M.; Lyon, J.L.; Stevenson, K.J., Amperometric detection of L-Lactate using nitrogen-doped carbon nanotubes modified with lactate oxidase. *Anal. Chem.* 2011, **83**, 8123-8129.
21. Serra, B.; Reviejo, A.J.; Parrado, C.; Pingarron, J.M., Graphite-Teflon composite bienzyme electrodes for the determination of L-lactate: Application to food samples. *Biosens. Bioelectron.* **1999**, 14, 505-513.
22. Corton, E.; Battaglini, F., Effect of milk proteins on the behavior of a biosensor based on poly(allylamine) containing an osmium complex wired to redox enzymes Part 2. Bienzymatic configuration. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, 511, 8-12.
23. Herrero, A.M.; Requena, T.; Reviejo, A.J.; Pingarron, J.M., Determination of L-lactic acid in yoghurt by a bienzyme amperometric graphite-Teflon composite biosensor. *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, 219, 556-559.

24. Zaydan, R.; Dion, M.; Boujtita, M., Development of a new method, based on a bioreactor coupled with an L-lactate biosensor, toward the determination of a nonspecific inhibition of L-lactic acid production during milk fermentation. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 8-14.
25. Ghamouss, F.; Ledru, S.; Ruillé, N.; Lantier, F.; Boujtita, M., Bulk-modified modified screen-printing carbon electrodes with both lactate oxidase (LOD) and horseradish peroxidase (HRP) for the determination of l-lactate in flow injection analysis mode. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 570, 158-164.
26. Mazzei, F.; Botrè, F.; Favero, G., Peroxidase based biosensors for the selective determination of D,L-lactic acid and L-malic acid in wine. *Microchem. J.* 2007, 87, 81-86.
27. Yao, Y.L.; Shiu, K.K., A mediator-free bienzyme amperometric biosensor based on horseradish peroxidase and glucose oxidase immobilized on carbon nanotube modified electrode. *Electroanalysis* **2008**, 20, 2090-2095.
28. Maeda-Yoita, K.; Aki, K.; Sagai, H.; Massey, V., L-lactate oxidase and L-lactate monooxygenase: mechanistic variations on a common structural theme. *Biochimie* **1995**, 77, 631-642.
29. Sullivan, P.A., Crystallization and properties of L-Lactate oxidase from *Mycobacterium smegmatis*. *J. Chem.* **1968**, 110, 363-371.
30. Umena, Y.; Yorita, K.; Matsuoka, T.; Kita, A.; Fukui, K.; Morimoto, Y., The crystal structure of L-lactate oxidase from *Aerococcus viridans* at 2.1 Å resolution reveals the mechanism of strict substrate recognition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 350, 249-256.
31. Furuichi, M.; Suzuki, N.; Dhakshnamoorthy, B.; Minagawa, H.; Yamagishi, R.; Watanabe, Y.; Goto, Y.; Kaneko, H.; Yoshida, Y. Yagi, H.; Waga, I.; Kumar, P.K.R.; Mizuno H., X-ray structures of *Aerococcus viridans* lactate oxidase and its complex with D-Lactate at pH 4.5 show an α -hydroxyacid oxidation mechanism. *J. Mol. Biol.* **2008**, 378, 436-446 .
32. Katakya, R.; Zawawi, R.M., Modification of the chiral selectivity of D-glucose oxidase and L-lactate oxidase in a collagen matrix. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, 12, 9183-9187.
33. Lavery, C.B.; MacInnis, M. C.; MacDonald, M. J.; Williams, J. B.; Spencer, C. A.; Burke, A. B.; Irwin, D. J. G.; D'Cunha, G.B., Purification of peroxidase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 8471-8476.
34. Ballesta-Claver, J.; Valencia-Mirón, M. C.; Capitán-Vallvey, L. F., One-shot lactate chemiluminescent biosensor. *Anal. Chim. Acta* **2008**, 629, 136-144.

CHAPITRE IV

IV.1. Introduction

IV.1.1 Généralités sur le formaldéhyde

Avec 20 millions de tonnes produites chaque année dans le monde entier, le formaldéhyde (méthanal), est l'un des produits chimiques commercialisés les plus importants¹. Aux températures ordinaires, le formaldéhyde pur est un gaz incolore avec une odeur piquante et suffocante. Cette odeur est détectable par la plupart des individus à des concentrations situées entre 0,05 et 1,3 mg/m³ (0,04 à 1 ppm)². Il est aussi très inflammable et peut conduire à la formation de mélanges explosifs avec l'air. Il est très soluble, même à froid, dans l'eau et dans les solvants polaires tels que l'éthanol, l'acétone et l'éther et peut polymériser rapidement. Les principales caractéristiques physico-chimiques de ce composé sont résumées dans le tableau IV.1.


Nom	Formaldéhyde
Température de fusion	- 92° C
Température d'ébullition (pression atmosphérique)	-19°C
Densité	0,816 g/cm ³ à -20°C
Solubilité dans l'eau	550 g/L
Densité de vapeur (air = 1)	1,04 – 1,06
Tension de vapeur	517 – 519 kPa à 25°C
Température d'auto-inflammation	424°C
Précautions	

Tableau.IV.1: Caractéristiques physico-chimiques du formaldéhyde

Le formaldéhyde n'est pas commercialisé sous forme gazeuse. Il est généralement vendu sous forme de solutions aqueuses à des concentrations massiques de 30 à 55 %, mais il est également disponible sous ses formes polymérisées, le trioxane (trimère) ou le paraformaldéhyde (polymère). Les solutions aqueuses commerciales renferment généralement de 0,5 à 15 % de méthanol comme inhibiteur de polymérisation. Le paraformaldéhyde se présente sous forme de poudre ou de cristaux blancs et peut être dépolymérisé en formaldéhyde dans l'eau chaude en présence de base³.

IV.1.2 Sources et toxicité du formaldéhyde

Le formaldéhyde est impliqué en tant que réactif intermédiaire dans la synthèse de produits chimiques, dans la fabrication de matières plastiques ou de résines pour le bois, le papier et les textiles. Les résines urée-formaldéhyde (>25 % de l'ensemble des résines à base de formaldéhyde) sont principalement utilisées comme adhésifs dans la fabrication de panneaux de particules, de panneaux de fibres et de contreplaqués. D'autres résines à base de formaldéhyde telles que le polyacétal, les résines phénoliques et les résines mélamine-formaldéhyde, sont utilisées comme adhésifs dans la fabrication de contreplaqués, de revêtements de surface, de mélanges à mouler et de résines thermodurcissables, ainsi que pour d'autres applications comme la fabrication d'accessoires de plomberie en plastique ⁴. Les émanations provenant des résines pour meubles, des papiers peints ou des peintures sont une source majeure de formaldéhyde à l'intérieur des maisons (Fig. V.1). Ce composé est également employé comme germicide, fongicide ou insecticide dans l'agriculture, ainsi que dans des produits de conservation ou comme agent de stérilisation dans le domaine médical ou la cosmétique ^{1, 5}. Le formaldéhyde se retrouve aussi dans la fumée de cigarette. On estime qu'une personne fumant 20 cigarettes par jour inhale 0,38 à 1 mg/j de ce composé⁴. Le formaldéhyde est également une substance endogène issue du métabolisme cellulaire humain et animal⁵. Chez l'Homme, la concentration en formaldéhyde dans le sang est d'environ 2 mg.L⁻¹ ^{5, 6}.

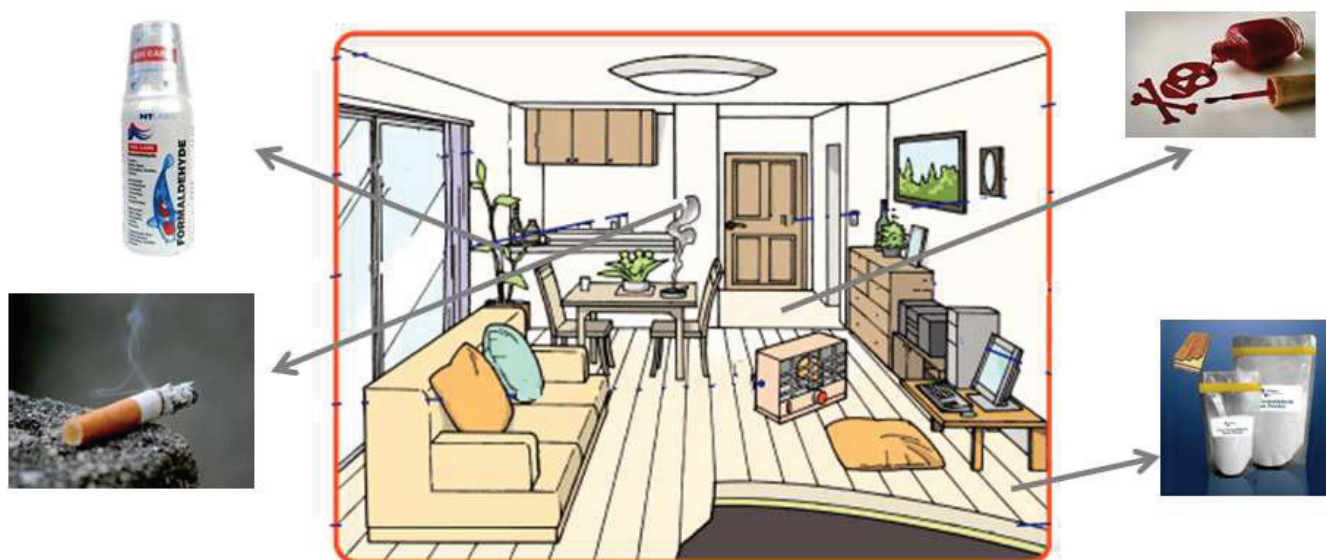


Fig.IV.1: Utilisations domestiques de produits contenant du formaldéhyde

Malgré sa présence et sa nécessité pour le métabolisme, le formaldéhyde reste une substance toxique et dangereuse pour l'Homme. L'application cutanée d'une solution à 1 % est faiblement irritante, tandis que les solutions concentrées sont corrosives.

La principale voie d'exposition au formaldéhyde est l'inhalation. A de faibles concentrations dans l'air, de l'ordre de 0,25 à 2 mg/m³ (0,2 à 1,6 ppm)⁵, il peut causer des irritations des yeux, du nez et de la gorge. L'irritation oculaire peut apparaître avant que l'odeur ne soit perçue. Dans les environnements où la concentration de formaldéhyde peut atteindre 10 à 30 mg/m³, les glandes lacrymales sont fortement sollicitées et des sensations de brûlure au niveau du nez et de la gorge peuvent apparaître, rendant la respiration difficile. Une exposition aiguë à des concentrations de 30 à 60 mg/m³ d'air entraîne des effets plus néfastes tels que des œdèmes pulmonaires².

Par ingestion, le formaldéhyde est très rapidement absorbé au niveau du tractus gastro-intestinal et subit les mêmes transformations métaboliques que par inhalation. Des effets importants sont généralement observés lors de l'ingestion d'une solution de formaldéhyde à 40 %, tels que des irritations de la bouche, de la gorge et de l'estomac, accompagnés de nausées et de vomissements. Dans les cas extrêmes, des convulsions et l'atteinte d'un état comateux peuvent être également observées. Plusieurs cas mortels ont également été rapportés dans la littérature⁵, l'ingestion de 10 à 100 mL de formaldéhyde étant considérée comme fatale chez l'Homme².

Le formaldéhyde a été classé comme cancérigène par l'agence américaine de protection de l'environnement et l'organisation mondiale de la santé⁵⁻⁷. Il est par ailleurs suspecté d'être toxique pour le développement humain et la reproduction⁸.

IV.1.3 Biocapteurs électrochimiques pour la détection du formaldéhyde

Les méthodes classiquement utilisées pour l'analyse du formaldéhyde sont principalement spectrofluorimétriques⁹ et chromatographiques¹⁰⁻¹³ (Tableau IV.2).

Bien que certains biocapteurs à cellules entières aient été rapportés pour la détection du formaldéhyde^{14, 15}, les enzymes sont les biorécepteurs les plus largement utilisés. La formaldéhyde déshydrogénase (FDH)¹⁶⁻²⁵ et dans une moindre mesure l'alcool oxydase (AOX)²⁶⁻²⁸, ont été proposées comme éléments de reconnaissance pour la construction de biocapteurs pour la détermination du formaldéhyde. L'alcool oxydase, AOX, ainsi que nous l'avons déjà mentionné dans le chapitre bibliographique, est une enzyme appartenant à la famille des oxydoréductases, qui catalyse principalement l'oxydation d'alcools de faible masse moléculaire, en particulier le méthanol, en utilisant l'oxygène comme cofacteur. Cette classe d'enzymes possède une activité catalytique relativement faible envers le formaldéhyde²⁹ et conduit donc à des biocapteurs de sensibilité et de

sélectivité plus faibles que celles des dispositifs à base de FDH. En outre, l'AOX est moins stable que la FDH³⁰. Cette dernière est également une enzyme de la famille des oxydoréductases, sous classe des alcools déshydrogénases à zinc. La réaction d'oxydation catalysée par la FDH utilise généralement le cofacteur NAD⁺ comme accepteur d'électrons et conduit à la production d'acide formique et de NADH selon la réaction I.53 (chapitre bibliographique).

<i>Techniques</i>	<i>Gamme linéaire</i>	<i>LD</i>	<i>Echantillons</i>	<i>Ref</i>
Fluorescence	0,06 – 10 nM	0,05 nM	air	9
Micro-extraction en phase liquide / HPLC	0,035 – 27 µM	0,16 µM	Champignons « shiitake »	10
Extraction par espace de tête + GC/MS	0,016 – 330 mM	6,6 µM	Excipients pharmaceutiques	11

Tableau.IV.2: Caractéristiques analytiques des différentes méthodes chromatographiques et spectrofluorimétriques pour la détermination du formaldéhyde

Les biocapteurs électrochimiques proposés dans la littérature sont essentiellement basés sur une détection ampérométrique du NADH produit à la surface de l'électrode. Cette technique offre l'avantage de permettre la régénération du cofacteur NAD⁺. Cependant, le potentiel optimal nécessaire à l'oxydation électrochimique du NADH est élevé, de l'ordre de 0,6 V à pH 7. A ce potentiel sont susceptibles de se produire d'autres réactions interférentes ainsi qu'un encrassement de l'électrode. L'oxydation du NADH conduit par ailleurs à la formation d'une forme de NAD⁺ enzymatiquement inactive. L'utilisation de médiateurs rédox chimiques ou de nanomatériaux tels que des nanotubes de carbone s'avère donc nécessaire pour résoudre ces problèmes^{16, 17, 22-24}.

Différents types de FDH ont été par ailleurs utilisés comme biorécepteurs pour l'élaboration de biocapteurs à formaldéhyde. La FDH recombinante extraite de la souche *Hansenula polymorpha* présente l'avantage d'être plus stable que les FDHs commerciales issues de la bactérie *Pseudomonas putida* ou de la levure *Candida boidini*^{21, 25}. Néanmoins, la production d'enzymes recombinantes est coûteuse, à la fois en temps et en argent. L'oxydation catalysée par les enzymes extraites d'*Hansenula polymorpha* ou *Candida boidini* nécessite par ailleurs la participation d'un deuxième coenzyme externe, le glutathion (GSH).

La FDH commerciale GSH-indépendante issue de *Pseudomonas putida*, que nous noterons par la suite pFDH, est donc l'enzyme la plus couramment utilisée dans la fabrication des biocapteurs dédiés à la détection du formaldéhyde. Il a été montré que le cofacteur externe NAD⁺ se lie au site actif de la pFDH par le biais d'une liaison forte mais non covalente favorisant la réaction catalytique³¹.

L'immobilisation de l'enzyme sur le transducteur doit donc être optimisée avec soin, non seulement pour maintenir la conformation initiale de la protéine, mais également pour favoriser l'approche du cofacteur et sa fixation sur le site actif de l'enzyme. Une des façons de procéder consiste à co-immobiliser le cofacteur et l'enzyme sur le transducteur. Différents matériaux, tels que le diéthylaminoéthyl-dextrane²⁵ ou le polyuréthane porteur de sites anioniques¹⁷ ont été proposés pour la co-immobilisation de la pFDH et de NAD⁺. Le cofacteur peut être introduit à forte concentration^{19, 25} ou régénéré. Une autre stratégie, relativement coûteuse mais qui évite l'étape de recyclage, consiste à ajouter NAD⁺ en solution à chaque mesure^{18, 21, 24, 26, 32}. Dans ce cas, le cofacteur doit être capable de diffuser à partir de la solution jusqu'à l'enzyme immobilisée sur le transducteur.

Dans ce travail, nous proposons un biocapteur conductimétrique miniaturisé et sensible pour le dosage du formaldéhyde dans des échantillons aqueux. Le biocapteur a été préparé par immobilisation de la pFDH sur la surface des microélectrodes interdigitées en or de l'IPSL par co-réticulation avec des vapeurs de GA en présence de BSA. Cette couche enzymatique a ensuite été recouverte d'une membrane Nafion. Il s'agit, à notre connaissance, du premier biocapteur dans lequel la pFDH est réticulée sur le transducteur puis recouverte d'une membrane Nafion et pour lequel la conductimétrie est utilisée comme mode de détection.

IV.2. Matériels et méthodes

IV.2.1 Réactifs

La pFDH (EC 1.2.1.46, 4 U.mg⁻¹ solide extraite de *Pseudomonas putida*), l'hydrate de β -nicotinamide adénine dinucléotide, (β -NAD, 98 %, issu d'une levure), le Nafion (5 % en masse dans un mélange d'alcools aliphatiques et d'eau contenant 15-20 % H₂O), le formaldéhyde (réactif ACS, 37 % en poids dans H₂O et contenant 10-15 % de méthanol en tant que stabilisant), le paraformaldéhyde (solide, 95 %), les pastilles de NaOH (>98 %), le n-butanol (>99,7 %), le n-pentanol (>99 %), l'acétaldéhyde (>99,5 %), le propionaldéhyde (>97 %), le butyraldéhyde (>99 %) et le poly(hydrochlorure d'allylamine) (PAH) dans l'eau ont été fournis par Sigma-Aldrich. L'éthanol (99,7 %) et le méthanol (99,8 %) provenaient de Carlo Erba. Les autres réactifs sont ceux déjà décrits dans le chapitre II.

IV.2.2 Préparation des solutions

Toutes les solutions aqueuses ont été préparées dans de l'eau ultrapure (résistivité >18 M Ω .cm).

La solution commerciale de Nafion a été diluée à 1 % (v/v) avec de l'eau ultra-pure, puis neutralisée avec une solution de NaOH 1 M pour obtenir un pH final entre 7 et 9.

Une solution mère de formaldéhyde (2 M) a été préparée par hydrolyse du paraformaldéhyde. Pour cela, 0,3 g du polymère ont été suspendus dans 5 mL d'eau ultrapure contenant 30 μ L de NaOH 1 M et le mélange a été maintenu pendant 4 h à 65°C jusqu'à ce que la solution devienne limpide. La concentration en formaldéhyde a été contrôlée par titrimétrie après réaction avec le sulfite. La solution, gardée à 4°C pendant au plus une semaine, a été utilisée pour la préparation des solutions étalons par dilution dans le tampon phosphate 5 mM pH 7.

Toutes les autres solutions mères destinées à l'analyse ont également été préparées dans du tampon phosphate 5 mM (pH 7) et conservées à 4°C jusqu'à utilisation.

IV.2.3 Construction du biocapteur

Les microélectrodes interdigitées utilisées sont celles produites à l'IPSL et la mesure a été réalisée en mode différentiel, comme décrit précédemment.

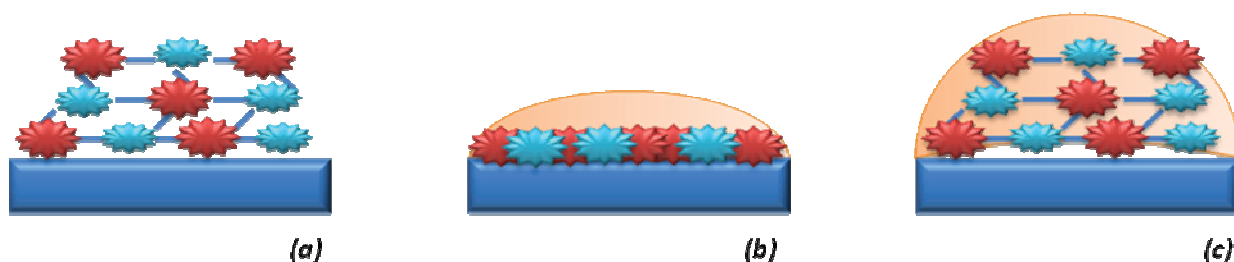
IV.2.3.1 Sans nanoparticules d'or

Le protocole de modification des électrodes est similaire à celui décrit précédemment, la biomembrane active contenant 5 % (m/v) de BSA, 10 % (m/v) de glycérol, 15 % (m/v) de pFDH et 6,5 % (m/v) de cofacteur NAD^+ , la membrane de référence étant quant à elle constituée de 20 % (m/v) de BSA, 10 % (m/v) de glycérol et 6,5 % (m/v) de NAD^+ .

Après dépôt de la solution enzymatique et de la solution de référence sur les zones sensibles du transducteur, le capteur a été laissé sécher pendant 30 minutes avant de réaliser la procédure d'immobilisation. Trois modes différents d'immobilisation ont été testés (Fig.IV.2). Dans le premier (Fig.IV.2 b), 0,3 μ L de la solution aqueuse de Nafion à 1 % ont été déposés sur les électrodes de référence et de travail et laissé sécher 1 h à température ambiante. Dans le second cas (Fig.IV.2 a), les deux paires d'électrodes ont été placées pendant 30 min dans une atmosphère saturée de vapeurs de GA. Après exposition, les membranes ont été mises à sécher à température ambiante pendant 1 h pour terminer la réaction de réticulation. Dans la dernière méthode (Fig.IV.2 c), la membrane enzymatique a été recouverte par 0,3 μ L de solution de Nafion à 1 % après co-réticulation et les capteurs ont été séchés à température ambiante pendant 1 h.

Quelle que soit la méthode utilisée, les électrodes ont été stockées à sec à 4° C après préparation, reconditionnées dans du tampon phosphate 5 mM pH 7 pendant 30 min avant la première

mesure et ensuite stockées à 4°C dans du tampon phosphate 20 mM pH 7 à la fin de chaque série de manipulations.



*Fig.IV.2 : Représentation schématique des trois modes d'immobilisation sur les surfaces des électrodes
Immobilisation par (a) réticulation avec des vapeurs de GA, (b) piégeage sous une membrane de Nafion, (c) la combinaison des deux méthodes*

IV.2.3.2 Avec nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or de diamètre 23 ± 5 nm (1 % en masse dans une solution de citrate 3 mM) ont été synthétisées au Laboratoire Hubert Curien, Université Jean Monnet de Saint-Etienne. 100 μ L de cette solution ont été prélevés puis les nanoparticules ont été récupérées par centrifugation pendant 20 min à 10000 tr/min à l'aide d'une centrifugeuse 2–6 K SIGMA de Fisher Bioblock Scientific. Elles ont ensuite été redispersées dans 100 μ L d'une solution aqueuse à 5 mg.mL^{-1} de PAH sous agitation mécanique pendant 15 min. Les nanoparticules d'or recouvertes de PAH (Fig.IV.3) ont finalement été récupérées par centrifugation (10000 tr/min, 30 min) et mélangées à 10 μ L de la solution de pFDH à 15 % (m/v) ou de la solution de référence préparées selon la méthode décrite dans le paragraphe précédent. Le reste du protocole est identique à celui utilisé pour la fabrication des biocapteurs sans nanoparticules, le troisième mode d'immobilisation (réticulation suivie de l'ajout de la membrane de Nafion) ayant été choisi.

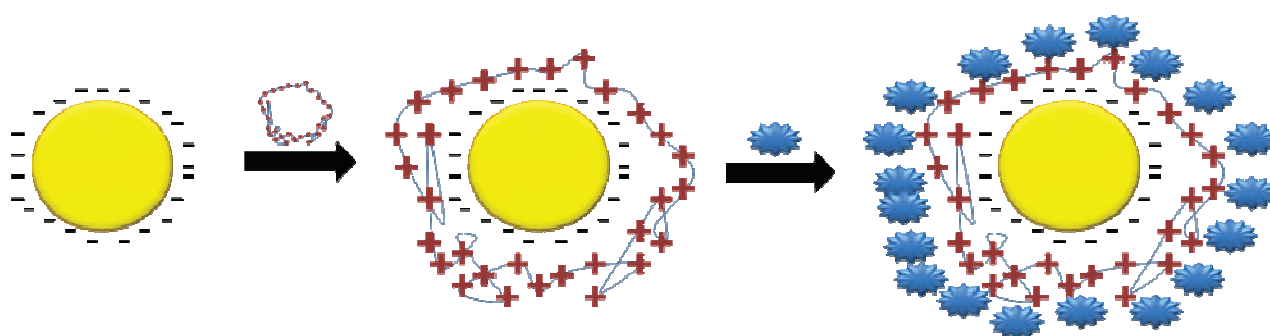


Fig.IV.3 : Schéma de fixation de la pFDH sur les nanoparticules

IV.2.4 Mesures électrochimiques

Les mesures conductimétriques ont été réalisées dans 5 mL de tampon phosphate 5 mM pH 7 dans lequel ont été ajoutés 50 μ L d'une solution à 2 mM de cofacteur NAD^+ . Une fois la stabilisation

du signal obtenue, 5 à 120 μL de solutions concentrées de formaldéhyde ou de mélanges équimolaires de formaldéhyde et de substance interférente (alcools et aldéhydes) ont été ajoutés. L'influence de différents paramètres (méthode d'immobilisation, temps de réticulation, quantité d'enzyme, de cofacteur, épaisseur de la membrane Nafion ou concentration en formaldéhyde ...) sur la réponse du biocapteur a été étudiée. Les vitesses initiales de réaction ont également été calculées à partir des 30 premières secondes de la réponse du biocapteur (portion linéaire). Les mesures ont été effectuées à 23 ± 2 °C comme décrit dans le chapitre II.

Les mesures par spectroscopie d'impédance électrochimique ont également été effectuées dans le tampon phosphate 5 mM pH 7 en utilisant l'analyseur VoltaLab 80 équipé d'un potentiostat PGZ 402 et contrôlé par le logiciel Volta Master 4.0 (Radiometer Analytical, France). Pour les mesures d'admittance, cet appareil sert à la fois à générer le signal sinusoïdal avec l'amplitude et la fréquence désirées et à extraire les parties réelles et imaginaires de l'admittance du système étudié. Les mesures d'admittance ont été réalisées dans une gamme de fréquences allant de 100 mHz à 100 kHz et une amplitude de 10 mV. Le balayage en fréquence a été répété plusieurs fois jusqu'à ce que deux courbes consécutives soient superposées.

IV.2.5 Mesure des paramètres cinétiques de la pFDH par la méthode du pH-stat

Le matériel utilisé est un système comprenant un pH-mètre PHM82, un titrateur TTT80, une autoburette ABU80, une cellule de mesure avec agitation mécanique et un enregistreur REC80 Servograph (Radiometer Analytical, France).

IV.3 Résultats et discussion

IV.3.1 Choix de la méthode d'immobilisation

Dans cette étude, quatre modes d'immobilisation de la pFDH ont été évalués :

- la membrane enzymatique est déposée sur le transducteur et recouverte de Nafion,
- l'enzyme est réticulée à l'aide de glutaraldéhyde,
- l'enzyme est réticulée puis recouverte de Nafion,
- l'enzyme est fixée sur des nanoparticules d'or déposées sur l'électrode, réticulée et recouverte de Nafion.

Chaque protocole a été répété sur deux capteurs et les huit biocapteurs ont été testés à 10 mM de formaldéhyde, le cofacteur étant dans tous les cas co-immobilisé avec l'enzyme dans la biomembrane. La concentration de pFDH était de 15 % (soit 0,045 mg d'enzyme déposée).

IV.3.1.1 Résultats en absence de nanoparticules d'or

Aucune variation de conductance n'a pu être détectée lorsque la membrane enzymatique était simplement déposée sur l'électrode et directement recouverte de Nafion (données non présentées). Nous avons vérifié que ce résultat ne provenait pas du relargage de l'enzyme en solution suite au décrochage de la membrane. Il est donc vraisemblable qu'une forte baisse de l'activité catalytique de l'enzyme soit à l'origine de la perte de signal. La forte densité des groupements sulfonates présente au niveau du Nafion permet l'interaction du polymère avec les régions de la protéine porteuses de groupements cationiques. On peut donc supposer, d'après les résultats obtenus, que ces interactions de type électrostatique entraînent une modification de la conformation de l'enzyme, en particulier au niveau de son site catalytique, induisant une perte significative d'activité. De manière très similaire, Paulikova *et al.*^{33, 34} ont rapporté l'existence d'interactions électrostatiques entre l'alcool déshydrogénase et des polysaccharides sulfatés tels que l'héparine, le sulfate de dextrane ou le sulfate de pentosane. Ces interactions, à l'origine d'une diminution de l'activité enzymatique, ont lieu principalement au niveau du site catalytique, mais d'autres domaines de l'enzyme semblent également pouvoir être concernés³³. Ces mêmes auteurs ont montré que cette association pouvait par ailleurs permettre de limiter la dénaturation thermique de l'enzyme³⁴. Ce changement de conformation, même s'il existe certainement aussi dans le cas de l'uréase, ne semble pas affecter trop sensiblement son site catalytique puisqu'une étude réalisée en vue du développement d'un biocapteur conductimétrique pour la détection de l'urée a montré que parmi les trois méthodes proposées pour immobiliser cette enzyme (réticulation avec GA, piégeage dans un gel de gélatine et piégeage dans du Nafion), l'immobilisation par le Nafion permettait de réaliser le meilleur compromis entre sensibilité et stabilité du capteur³⁵.

Ainsi que nous l'avons vu dans le chapitre bibliographique, la pFDH est une déshydrogénase de structure tétramérique. La réaction d'oxydation du formaldéhyde conduit à la production de protons qui s'accumulent au niveau de la membrane de Nafion et provoquent une diminution locale du pH. L'activité des déshydrogénases en milieu acide est souvent limitée du fait de la dissociation des sous-unités³⁶. La fixation de l'enzyme sur/dans un support^{37, 38} ou son aggrégation³⁹, suivie de sa réticulation permet généralement de stabiliser la protéine par rigidification de sa structure⁴⁰.

Ainsi que le montre la figure IV.4, la réponse du biocapteur observée lorsque l'enzyme est réticulée et recouverte ou non de Nafion, est importante, confirmant l'effet bénéfique de l'étape de

réticulation. La réponse est deux fois plus forte en présence qu'en absence de Nafion. Par contre, le signal ne met que 25 min pour se stabiliser en absence de Nafion alors qu'il est nécessaire d'attendre deux fois plus de temps en présence de la membrane. La limite de détection n'est par ailleurs pas améliorée puisque le bruit de fond est également doublé. L'augmentation de la sensibilité du biocapteur peut s'expliquer par la production de protons lors de la réaction enzymatique. Ces ions présentent une forte conductivité et vont être retenus au niveau de la membrane, provoquant une augmentation significative de la conductance locale, et donc du signal du biocapteur. Par contre, le Nafion crée une barrière diffusionnelle supplémentaire à l'origine de l'augmentation du temps nécessaire pour atteindre l'équilibre entre les ions générés dans la biomembrane et ceux de l'électrolyte. Des résultats similaires ont été obtenus par Soldatkin *et al*⁴¹ qui ont utilisé le même transducteur mais la glucose oxydase à la place de la pFDH.

Compte tenu des résultats obtenus, le troisième mode d'immobilisation combinant réticulation et utilisation de Nafion a donc été préféré afin d'obtenir la meilleure sensibilité.

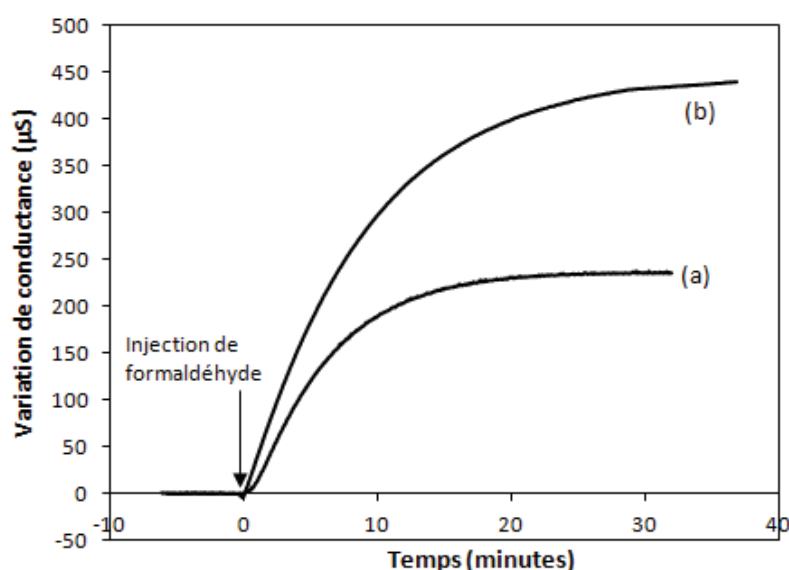


Fig.IV.4.: Influence du mode d'immobilisation de l'enzyme sur le signal du biocapteur. Réticulation 30 min à l'aide de vapeurs de GA sans (a) et avec un revêtement de Nafion (b). 0,045 mg de pFDH et 13 µg NAD^+ co-immobilisés dans la biomembrane - $[\text{HCHO}] = 10 \text{ mM}$ dans du tampon phosphate 5 mM, pH 7, sans ajout supplémentaire de cofacteur en solution, $T = 23 \pm 2^\circ\text{C}$

IV.3.1.2 Résultats en présence de nanoparticules d'or

Nous avons essayé d'améliorer encore cette limite de détection en immobilisant l'enzyme, non plus directement sur le transducteur, mais sur des nanoparticules d'or déposées ensuite sur l'électrode, les étapes suivantes de réticulation et d'ajout du Nafion n'étant pas modifiées. Malheureusement, le signal conductimétrique a été divisé par un facteur 2 par rapport à celui obtenu précédemment. Les expériences suivantes ont donc été menées en absence de nanoparticules d'or.

IV.3.2 Optimisation des paramètres liés à l'enzyme et à son co-facteur

Afin de maximiser les performances du biocapteur, d'autres paramètres affectant la réaction enzymatique, tels que la quantité d'enzyme, la concentration et le mode d'introduction du NAD^+ , ont également été optimisés.

IV.3.2.1 Quantité d'enzyme

L'influence de la quantité de pFDH sur la pente initiale de la réponse du biocapteur ainsi que sur le signal à l'équilibre a été étudiée dans la gamme 0,015-0,045 mg en faisant varier de 0,1 à 0,3 μL le volume de solution enzymatique à 15 % (m/v) de pFDH déposée sur l'électrode. La concentration de pFDH a dû être limitée à 15 % afin d'éviter sa précipitation. De la même manière, le volume maximal des dépôts a été de 0,3 μL en raison des faibles dimensions des parties sensibles des capteurs. Deux capteurs ont été préparés pour chaque quantité d'enzyme.

Comme le montre la figure IV.5, la vitesse initiale de réaction ainsi que la variation de conductance à l'équilibre obtenue pour 10 mM de formaldéhyde augmentent de manière quasi linéaire avec la quantité de pFDH. Le rapport signal/bruit est également fortement amélioré puisqu'il est de 159 pour 0,015 mg d'enzyme et passe à 576 pour 0,030 mg puis atteint 1187 pour 0,045 mg. Il semble qu'aucun problème d'accessibilité ou de fonctionnement de l'enzyme liée à un phénomène d'encombrement ne se produise, même au niveau de concentration le plus élevé. De même, contrairement à ce qui avait été observé avec l'AOX (chapitre II), l'utilisation d'une forte quantité d'enzyme n'a pas provoqué de décollement de la membrane, ceci provenant vraisemblablement de la présence d'une couche couvrante de Nafion. Il a donc été décidé d'opérer avec 0,045 mg d'enzyme dans les expériences ultérieures.

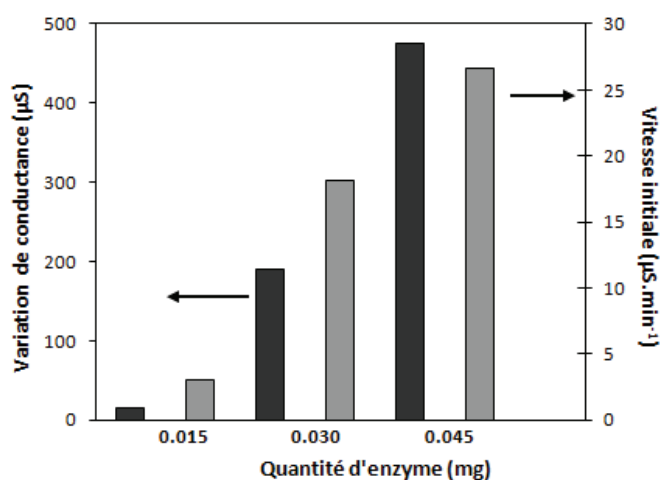


Fig.IV.5 : Influence de la quantité de pFDH sur le signal du biocapteur et sur la pente initiale de la réponse du biocapteur. pFDH et NAD^+ co-immobilisés dans la biomembrane - $[\text{HCHO}] = 10 \text{ mM}$ dans du tampon phosphate 5 mM, pH 7, sans ajout supplémentaire de cofacteur en solution, $T = 23 \pm 2^\circ\text{C}$

IV.3.2.2 Paramètres liés au co-facteur

Toutes les expériences précédentes ont été réalisées en co-immobilisant de fortes quantités de NAD^+ avec la pFDH, comme proposé dans les références ¹⁸ et ²⁵. Le cofacteur n'a été ni régénéré, ni ajouté en solution. Cependant, dans ces conditions, une décroissance rapide du signal du biocapteur est observé (Fig.IV.6 a). 50 % du signal est perdu après la première mesure, 80 % après la deuxième, ce que nous pouvons attribuer à un relargage de NAD^+ à travers la membrane de Nafion. Par contre, la figure IV.6 b montre que l'ajout de 20 μM de cofacteur à chaque mesure permet de maintenir le signal pratiquement constant après 8 mesures effectuées sur une période de 12 jours. Aucun changement significatif de l'intensité du signal n'a pu être observé par augmentation de la concentration de NAD^+ de 20 à 80 μM , que ce soit pour l'analyse de 5 mM ou de 110 mM de formaldéhyde. La valeur de 20 μM de NAD^+ a donc été considérée comme optimale pour la suite de notre étude.

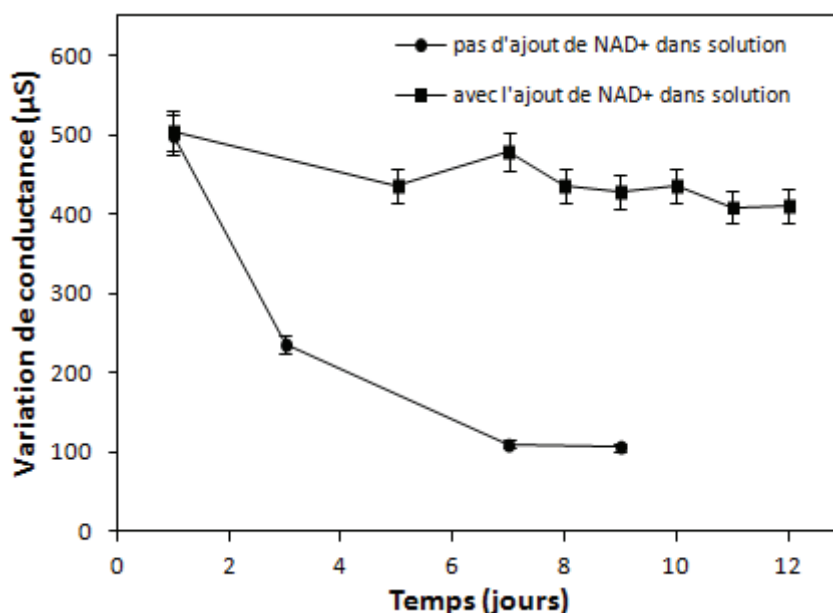


Fig.IV.6 : Effet de l'ajout supplémentaire de 20 μM de NAD^+ dans la solution de mesure sur la stabilité du signal du biocapteur. 0,045 mg de pFDH et 13 μg NAD^+ co-immobilisés dans la biomembrane $[\text{HCHO}] = 10 \text{ mM}$ dans du tampon phosphate 5 mM, pH 7, $T = 23 \pm 2^\circ\text{C}$

IV.3.3 Optimisation des paramètres d'immobilisation

IV.3.3.1 Paramètres de réticulation de la membrane enzymatique

Trois biocapteurs ont tout d'abord été préparés en faisant varier le temps d'exposition aux vapeurs de GA à 10, 15 et 30 min. L'évolution de la réponse des biocapteurs a été suivie sur une période de 24 jours. Les mesures ont été réalisées pour une concentration de 10 mM de formaldéhyde et 20 μM de NAD^+ ont été ajoutés en solution à chaque mesure.

Comme on peut le voir sur la figure IV.7, le signal le plus faible est obtenu pour le plus petit temps de réticulation (10 min), ce qui peut être attribué à un relargage de l'enzyme lié à un temps de réticulation insuffisant. La réponse du biocapteur augmente lorsque le temps de réticulation passe à 15 min, mais l'instabilité du signal également. Dans ce cas, la structure du réseau polymérique est plus dense, ce qui limite la libération de la pFDH, mais les enzymes immobilisées au sein de la matrice restent encore suffisamment flexibles pour subir des changements conformationnels irréversibles au cours des mesures successives, ce qui provoque une inactivation progressive, et donc une diminution du signal du biocapteur avec le temps. En augmentant encore le temps d'exposition, donc le taux de réticulation, l'enzyme devient moins flexible tout en demeurant active. Le signal initial et sa stabilité dans le temps sont maximaux. Nous avons donc sélectionné un temps de réticulation de 30 min pour les expériences suivantes. Un temps de réaction optimal de 5 min avait été obtenu pour la réticulation de l'acétylcholinestérase à 37°C^{35,42}.

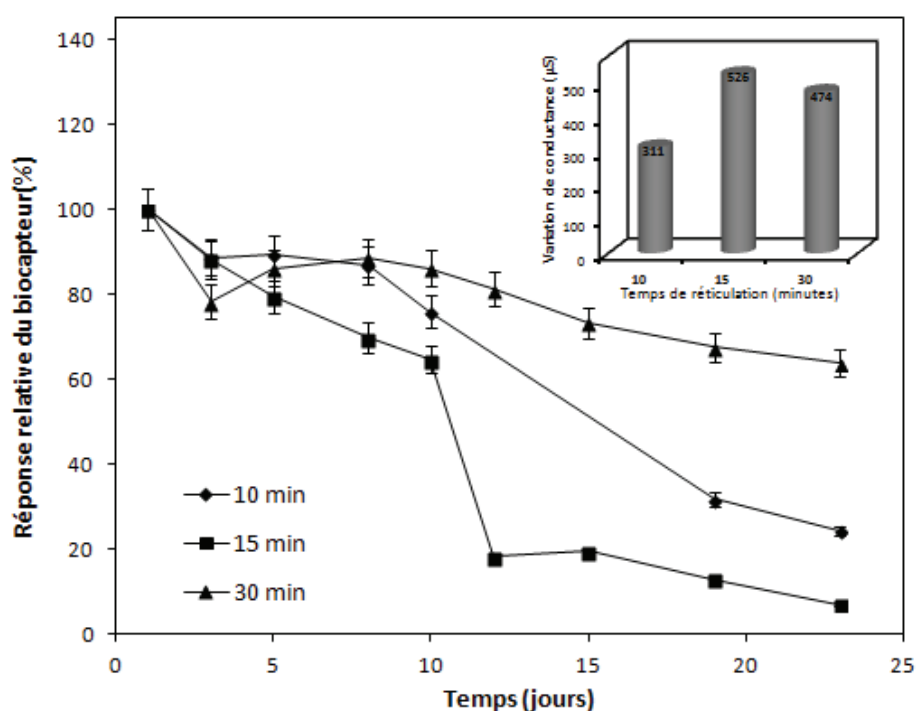


Fig.IV.7: Influence du temps de réticulation sur la stabilité du biocapteur et sur le signal (insert). 0,045 mg de pFDH et 13 μg NAD^+ co-immobilisés dans la biomembrane et la membrane Nafion [HCHO] = 10 mM dans du tampon phosphate 5 mM, pH 7, $T = 23 \pm 2^\circ\text{C}$

IV.3.3.2 Optimisation de l'épaisseur de la membrane Nafion

Dans les expériences suivantes, quatre biocapteurs ont été préparés par dépôt de la solution enzymatique, en faisant varier cette fois le volume de solution de Nafion 1 % déposé après réticulation (0,1 ; 0,2 ; 0,3 et 0,4 μL). Les différentes étapes de l'élaboration des capteurs ont été caractérisées par

spectroscopie d'impédance électrochimique et la réponse conductimétrique du biocapteur a été mesurée pour une concentration de 2 mM en formaldéhyde.

Ainsi que le montre la figure IV.8, une augmentation de l'admittance interfaciale est observée après chaque étape de fabrication du biocapteur, ce que l'on peut expliquer par l'ajout d'espèces chargées (enzyme, NAD^+ et Nafion). Les variations de la partie réelle de l'admittance mesurée à 40 kHz augmentent également avec le volume de la solution de Nafion et décroissent au-delà de 0,3 μL (Fig. IV.9), indiquant que les propriétés conductrices de la membrane sont maximales pour un dépôt de 0,3 μL et qu'au-delà la résistance à la diffusion l'emporte sur la capacité de conductance du biofilm.

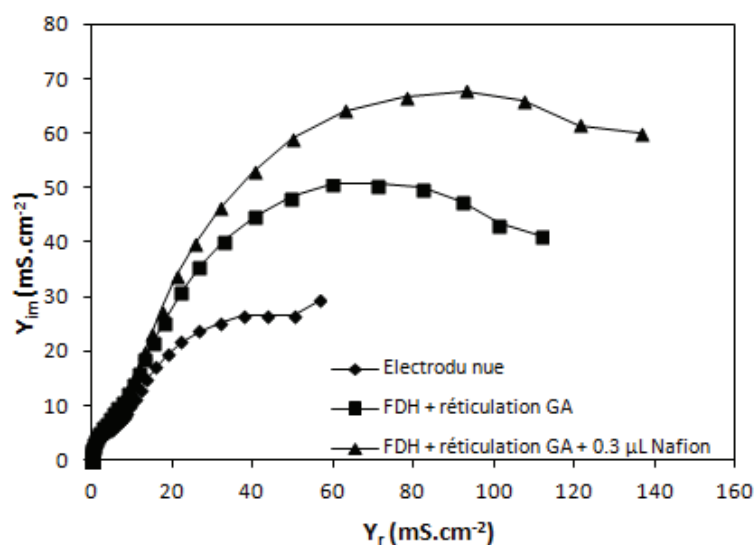


Fig.IV.8 : Influence des modifications d'électrode sur les diagrammes d'admittance de Nyquist. Potentiel appliqué: 10 mV, gamme de fréquence balayée: 100 mHz - 100 kHz. Mesure en tampon phosphate 5 mM, pH 7

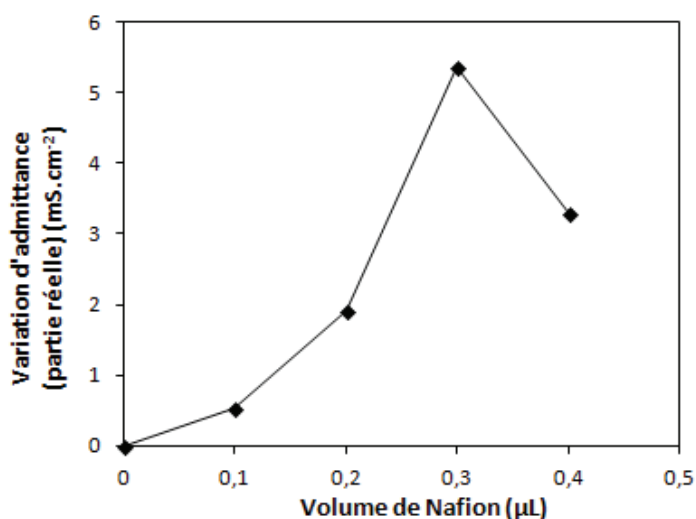


Fig.IV.9 : Influence de l'épaisseur de la membrane Nafion sur la partie réelle de l'admittance à 40 kHz. Potentiel appliqué: 10 mV. Mesure en tampon phosphate 5 mM, pH 7

Les mêmes capteurs ont été ensuite mesurés par conductimétrie afin d'évaluer l'influence de l'épaisseur du film de Nafion sur leur temps de réponse et sur la variation de conductance à l'équilibre. En examinant la figure IV.10, on peut remarquer que la variation de conductance augmente avec le volume déposé jusqu'à 0,3 μL . Ce résultat peut s'expliquer par l'accumulation croissante de protons produits par la réaction enzymatique au sein de la membrane. Par contre, la diffusion des ions à travers la membrane, et donc le temps de réponse, n'est pas fortement affectée par l'épaisseur de la membrane dans le domaine étudié.

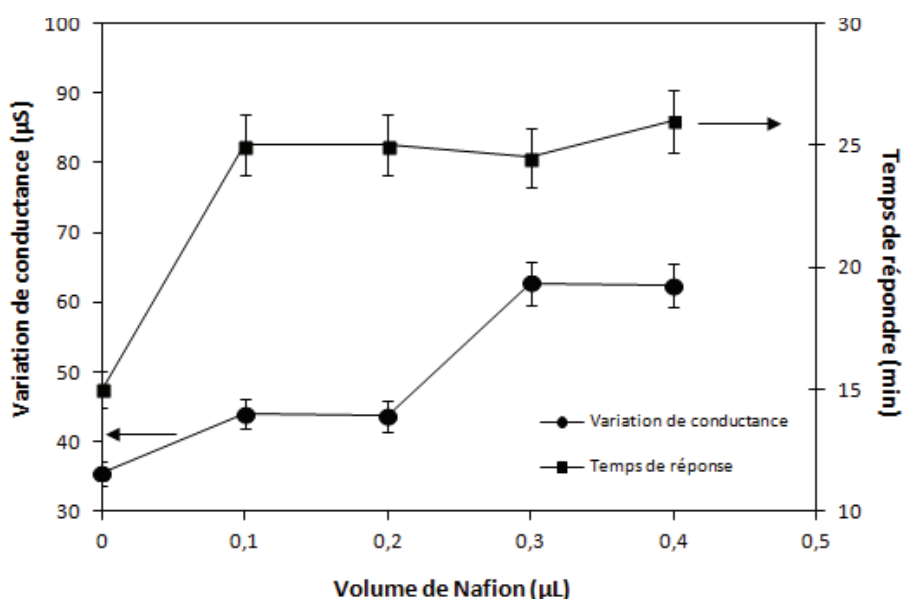


Fig.IV.10 : Effet de l'épaisseur de la membrane Nafion sur le signal du biocapteur (●) et sur le temps de réponse (■).
 0,045 mg de pFDH et 13 μg NAD^+ co-immobilisés dans la biomembrane par réticulation (vapeur de GA, 30 min)
 $[\text{HCHO}] = 2 \text{ mM}$ - 20 μM NAD^+ ajouté dans la solution de tampon phosphate 5 mM, pH 7, $T = 23 \pm 2^\circ\text{C}$

IV.3.4. Optimisation des paramètres de mesure

IV.3.4.1 Pouvoir tampon et force ionique

Dans cette étude, nous avons fait varier la force ionique de deux manières, la première en ajoutant des concentrations croissantes en NaCl (5 à 120 mM) au milieu de mesure constitué de tampon phosphate 5 mM pH 7, la deuxième en augmentant la concentration du tampon phosphate de 2 à 100 mM, ce qui a pour conséquence d'augmenter également le pouvoir tampon du milieu.

Comme le montre la figure IV.11, une forte diminution de la réponse du biocapteur a été observée pour des concentrations croissantes en sel ou en tampon, que la membrane de Nafion soit ajoutée ou non. La chute est cependant légèrement moins prononcée en présence qu'en absence de Nafion (Fig.IV.11b). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus dans d'autres études menées sur des biocapteurs enzymatiques conductimétriques^{41, 43, 44}. Ils peuvent être attribués en partie à la baisse

d'efficacité de transduction liée à l'augmentation de conductance (polarisation des électrodes). Par ailleurs, les ions phosphates, en s'associant aux protons générés à la surface de l'électrode, facilitent leur transport de la membrane vers la solution. La concentration locale en ions H^+ diminue donc lorsque la concentration en tampon augmente, conduisant à une décroissance du signal conductimétrique. L'ajout de la membrane de Nafion chargée négativement crée une barrière à la diffusion des ions phosphates et chlorures, réduisant le mécanisme de transport par les ions phosphates et favorisant la diffusion des protons vers la solution par échange avec les ions Na^+ . L'augmentation de la concentration en NaCl en présence de Nafion résulte donc en un flux de protons plus élevé et donc en une baisse du signal conductimétrique, mais dans une moindre mesure qu'en absence de Nafion.

Le signal le plus élevé est donc obtenu en présence de Nafion et à la plus faible des concentrations en ions phosphates testée (2 mM). Néanmoins, la sensibilité aux faibles variations de conductivité est plus forte, ce qui diminue la répétabilité des mesures. Une concentration en tampon de 5 mM a donc été considérée comme optimale pour obtenir le meilleur compromis entre sensibilité et reproductibilité.

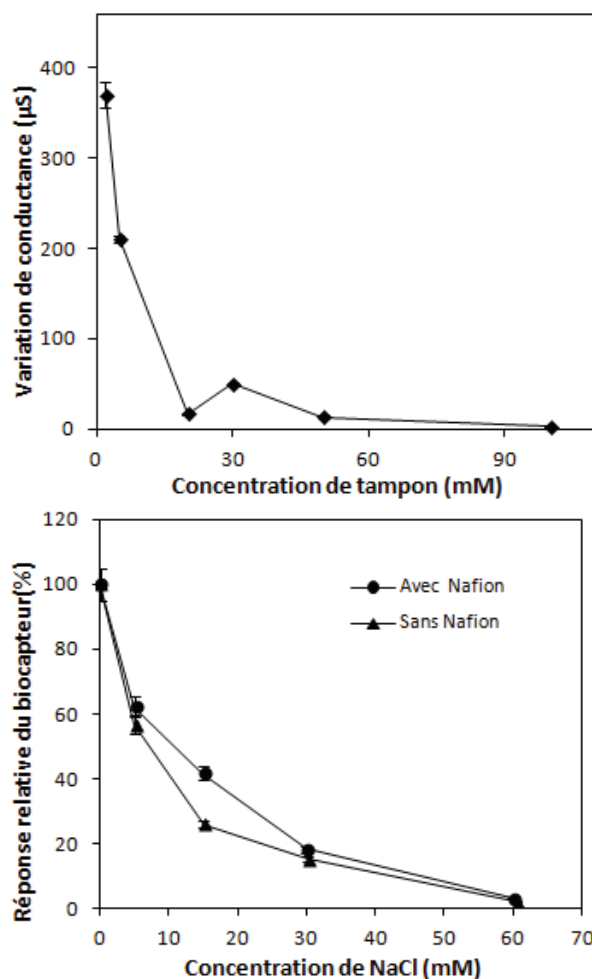


Fig.IV.11: Influence sur la réponse du biocapteur de la concentration en tampon (a) ou de NaCl (b) en présence (●) et en absence (▲) de membrane Nafion. 0,045 mg de pFDH et 13 μg NAD^+ co-immobilisés dans la biomembrane par réticulation (GA vapeur, 30 min). $[HCHO] = 2 \text{ mM}$ - 20 μM NAD^+ ajoutés dans le tampon phosphate 5 mM, pH 7, $T = 23 \pm 2^\circ C$

IV.3.4.2 pH

Afin de déterminer le pH optimal de mesure, nous avons construit trois biocapteurs et étudié l'évolution de leur réponse à 5 mM de formaldéhyde dans une gamme de pH allant de 5 à 9. Ainsi que le montre la figure IV.12, le signal le plus intense a été obtenu pour une valeur de pH de 7,1, relativement proche du pH optimum de fonctionnement de l'enzyme rapporté dans la littérature (7,8⁴⁵ ou 8,9⁴⁶). La différence peut être liée à une modification de la conformation de l'enzyme suite à son immobilisation et/ou à une modification de la force ionique accompagnant les variations de pH.

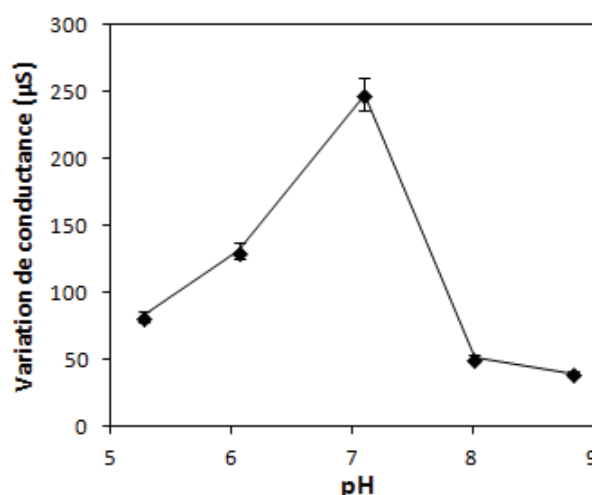


Fig.IV.12 : influence du pH sur le signal du biocapteur conductimétrique
0,045 mg de pFDH et 13 µg NAD⁺ co-immobilisés dans la biomembrane par réticulation (vapeur de GA, 30 min)
[HCHO] = 5mM - 20 µM de NAD⁺ ajoutés dans le tampon phosphate 5 mM., T = 23°C ± 2°C

IV.3.5 Caractéristiques analytiques du biocapteur conductimétrique

Les caractéristiques analytiques du biocapteur conductimétrique ont ensuite été évaluées dans les conditions optimales définies précédemment en utilisant 14 solutions étalons dans la gamme de concentrations comprises entre 0,06 et 140 mM. Trois répliques ont été effectuées à chaque niveau de concentration.

Comme on le voit sur la figure IV.12, la réponse du biocapteur est linéaire jusqu'à 10 mM de formaldéhyde et augmente ensuite progressivement pour atteindre un plateau à environ 150 mM. Le coefficient de corrélation et la sensibilité sont respectivement de 0,998 et 46 µS.mM⁻¹. La limite de détection, calculée comme étant la concentration conduisant à un signal égal à trois fois le rapport signal sur bruit est de 18 µM, correspondant à une concentration atmosphérique de 3 ppb⁴⁷. Cette valeur est bien inférieure à la limite de la perception olfactive par les humains (0,5 à 0,83 ppm) ainsi qu'à la limite maximale d'exposition à court terme (30 minutes) de 100 ppb pour la qualité de l'air intérieur recommandée par l'Organisation Mondiale de la Santé. Cette valeur est par ailleurs inférieure

à celles rapportées dans la littérature pour les biocapteurs potentiométriques ou conductimétriques (Tableau IV.3).

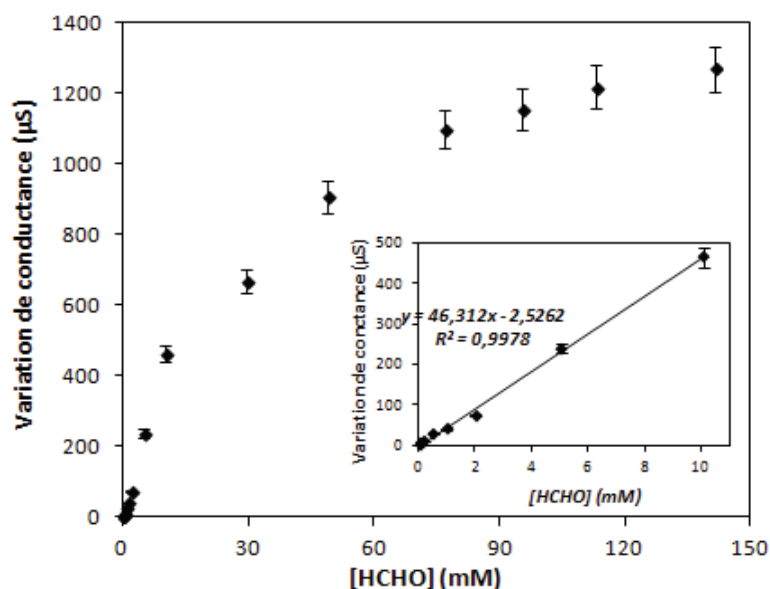


Fig.IV.13: Droite d'étalonnage du biocapteur conductimétrique mesurée dans les conditions optimales. 0,045 mg de pFDH et 13 µg NAD⁺ co-immobilisés dans la biomembrane par réticulation (vapeur de GA, 30 min). Membrane Nafion 20 µM de NAD⁺ ajoutés dans le tampon phosphate 5 mM pH 7, T = 23±2°C

La reproductibilité à court terme du biocapteur a été évaluée à 3 concentrations dans le domaine 1-10 mM. Le coefficient de variation calculé à partir de cinq mesures consécutives réalisées le même jour avec le même capteur est inférieur à 5 % dans le domaine de concentrations évalué (voir Fig.IV.14 pour les valeurs obtenues à 5 mM de formaldéhyde).

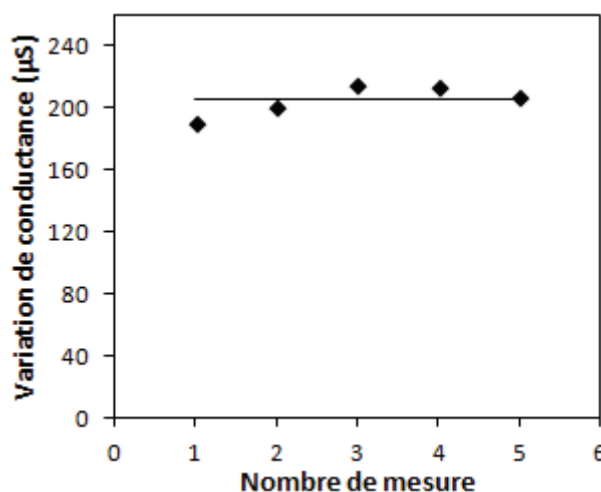


Fig.IV.14 : Reproductibilité à court-terme de la réponse du biocapteur. 0,045 mg de pFDH et 13 µg NAD⁺ co-immobilisés dans la biomembrane [HCHO] = 5 mM. 20 µM de NAD⁺ ajoutés dans le tampon phosphate 5 mM, pH 7, T = 23±2°C

Chapitre IV : Développement d'un biocapteur pour l'analyse du formaldéhyde en milieu aqueux

Transduction	Enzyme	Electrode	Immobilisation	Domaine linéaire (mM)	LD (μ M)	Echantillons	Ref
Conductimétrie	pFDH	Au IDE	Réticulation GA + Nafion	0,05 – 10	18	Eau du robinet Eau de rivière	ce travail
	pFDH HansFDH	Au IDE	Réticulation GA	10 – 200 25 – 200	-	Formidron, Descoton forte, Formalin	25
	AOX	Au IDE	Réticulation GA	0,05 – 500	50	Formidron, Descoton forte, Formalin	27
	HansFDH	Graphite platiné	Piégeage dans un polymère rédox contenant Os + Nafion	0,027 – 20	3	Formidron, Descoton forte, formalin	21
Ampérométrie	pFDH	Carbone vitreux	Piégeage dans de la silice mésoporeuse	0,004 – 1	1,2	-	22
	pFDH	Carbone sérigraphié modifié avec MWCNTs	-	0,0001 - 1,5	0,1	Milieu de relargage de cellules humaines traitées avec des prodrogues anticancéreux	23
	pFDH	Or	Enzyme mélangée avec du Nafion	0,03 - 0,3	0,5	Maquereau	32
	AOX	Carbone sérigraphié platiné	Réticulation avec du GA	0,06 - 0,46	60	Echantillons commerciaux pour l'histologie	48
Potentiométrie	AOX	Ag/AgCl sérigraphiée sensible à H ⁺	Fixation covalente à des microsphères de polymère acrylique	0,3 – 316	300	Crevettes	28

Tableau IV.3 : Comparaison des performances de quelques biocapteurs rapportés dans la littérature pour la détection du formaldéhyde

Afin de tester la stabilité de stockage, un capteur a été mesuré 2 à 3 fois par semaine pendant 24 jours et gardé à 4°C dans un tampon phosphate 20 mM pH 7 entre deux mesures. Ainsi que nous l'avons déjà vu précédemment, la réponse du biocapteur est restée stable pendant 12 jours (Fig.IV.6). Nous voyons par contre (Fig.IV.7) que sa réponse décroît par la suite, 65 % de la valeur initiale étant retrouvée après 24 jours de stockage.

IV.3.6 Application à des échantillons réels

Le biocapteur a ensuite été utilisé pour la détermination du formaldéhyde dans des échantillons d'eau dopés. Au préalable, une étude d'interférence a été effectuée, en visant deux types d'interférents potentiels : les alcools aliphatiques à chaînes courtes et les aldéhydes. Le méthanol est utilisé comme stabilisateur dans la solution de formaldéhyde commercialisée par Sigma. D'après les travaux d'Ogushi *et al*⁴⁶, il semble que la pFDH libre n'ait aucune activité catalytique vis-à-vis du méthanol. Cependant, la sélectivité de l'enzyme pouvant être modifiée après immobilisation, nous avons testé sa réponse vis-à-vis du méthanol et de différents autres alcools : l'éthanol (EtOH), le n-butanol (BuOH) et le n-pentanol (PenOH). Par ailleurs, l'activité de la pFDH libre vis-à-vis d'autres aldéhydes tels que l'acétaldéhyde, le propionaldéhyde et le butyraldéhyde a été étudiée.

Comme attendu, aucun signal n'a été observé pour les alcools utilisés comme seul substrat à une concentration de 10 mM. De même, le signal du biocapteur obtenu pour une concentration de 10 mM en formaldéhyde n'est pas modifié par ajout de la même concentration molaire en alcool (Fig.IV.15).

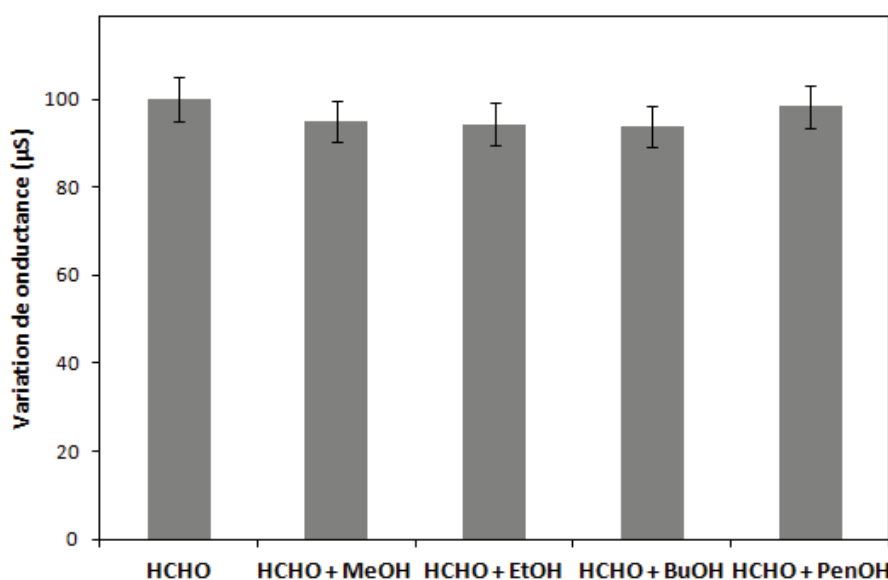


Fig.IV.15: Etude d'interférences avec différents alcools primaires à chaîne linéaire (méthanol à pentanol).
[HCHO] = [Alcool] = 10 mM dans le tampon phosphate 5 mM pH 7

Par contre, les mesures réalisées en présence des différents aldéhydes seuls, à une concentration de 10 mM, révèlent une perte de sélectivité du biocapteur. Ainsi que le montre la Fig.IV.16, les variations de conductance obtenues pour le propionaldéhyde et le butyraldéhyde sont du même ordre de grandeur que celle enregistrée pour le formaldéhyde tandis qu'en présence d'acétaldéhyde, cette variation est 3 fois plus importante.

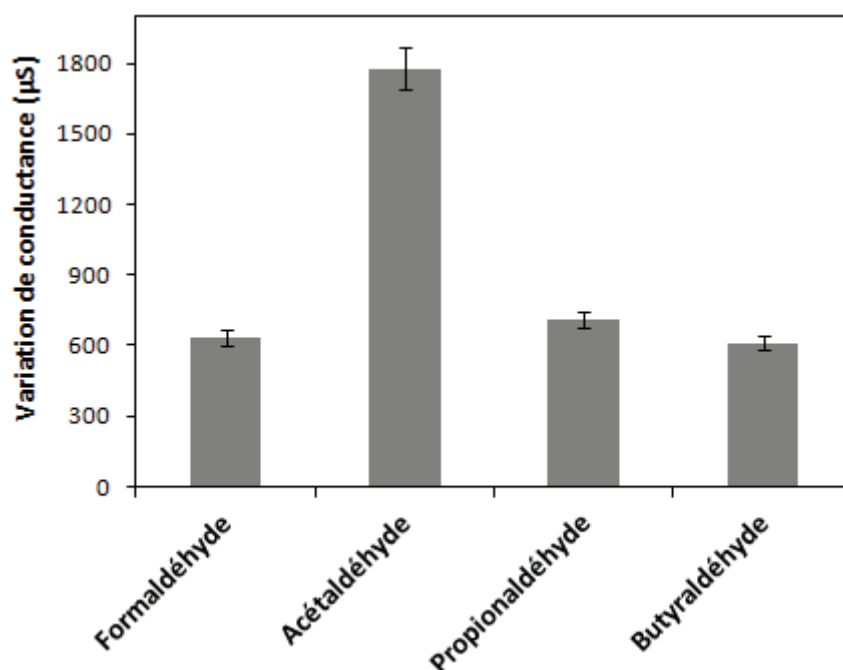


Fig.IV.16: Comparaison des réponses du biocapteur à pFDH vis-à-vis de différents aldéhydes.
[Aldéhyde] = 10 mM dans tampon phosphate 5 mM pH 7

Ces résultats ne sont pas en accord avec d'autres études, par exemple celles de Bareket *et al*²³, Kudo *et al*⁴⁹ et Mitsubayashi *et al*⁵⁰ dans lesquelles les réponses des biocapteurs à pFDH développés ne présentent aucun signal ou des signaux très faibles pour l'acétaldéhyde. Cependant, les résultats rapportés dans la littérature visent à déterminer la concentration en aldéhyde sous forme de vapeurs^{49, 50} ou en solution mais après diffusion dans le milieu de mesure de ces aldéhydes issus de l'hydrolyse cellulaire de précurseurs²³. La diffusion des aldéhydes dans le milieu réactionnel, leur interaction avec la pFDH et finalement la grandeur du signal mesuré peuvent être différentes. Il est également difficile de comparer les résultats obtenus par des méthodes de détection différentes. En l'occurrence, elles sont basées sur des mesures ampérométriques^{23, 50} ou de fluorescence du NADH⁴⁹.

Afin de vérifier les caractéristiques de l'enzyme utilisée dans notre travail, nous avons procédé à des expériences sur l'enzyme libre. L'activité de la pFDH peut être suivie par la méthode du pH-stat. En effet, la réaction d'oxydation de l'aldéhyde libère des espèces acides qui peuvent être titrées par

une base forte. L'addition de titrant permet de maintenir le pH du milieu réactionnel (non tamponné), d'où le terme de pH-stat.

Lorsqu'on laisse la réaction enzymatique se dérouler jusqu'à épuisement du substrat, on constate que l'oxydation du formaldéhyde, catalysée par la pFDH, conduit à l'addition de 2 moles de OH^- par mole de formaldéhyde. Ceci correspond bien à la neutralisation des 2 ions H^+ produits par la réaction enzymatique (Eq. I.53 p. 56).

L'étude réalisée en présence de concentrations croissantes d'aldéhyde a permis de déterminer les paramètres cinétiques de la pFDH vis-à-vis du formaldéhyde et de l'acétaldéhyde (Tableau IV.4). Par contre, aucune activité n'a pu être mise en évidence pour les aldéhydes à plus longue chaîne, le propionaldéhyde et le n-butyraldéhyde.

<i>Paramètres cinétiques</i>	<i>Formaldéhyde</i>	<i>Acétaldéhyde</i>	<i>Propionaldéhyde</i>	<i>n-Butyraldéhyde</i>
K_M (mM)	0,1	3,5	-	-
V_M ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	0,62	0,45	-	-
V_i (nmol OH^-/min)	23,1	4,7	-	-

*Tableau.IV.4: Paramètres cinétiques (V_M et K_M) de la pFDH pour HCHO et CH_3CHO par mesures de pH-stat. 0,020 mg de pFDH et 4 mg de NAD^+ dans 3 mL de solution de NaCl 20 mM, pH 7,5 – titrage par NaOH 4 mM $[\text{HCHO}] = 0,25\text{-}0,95 \text{ mM}$ – $[\text{CH}_3\text{CHO}] = 0,95\text{-}8,6 \text{ mM}$ – $[\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHO}] = [\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CHO}] = 0,95 \text{ et } 2,9 \text{ mM}$
 V_i : vitesse initiale déterminée pour [aldéhyde] = 1 mM*

La pFDH a une affinité 35 fois plus élevée pour le formaldéhyde que pour l'acétaldéhyde alors que les valeurs des vitesses maximales sont voisines. Lorsqu'ils sont présents à la concentration de 0,95 mM, la vitesse initiale d'oxydation du formaldéhyde est 5 fois plus forte que celle de l'acétaldéhyde. Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux⁴⁵ conduits avec l'enzyme libre qui font état d'un rapport de 2 en faveur du formaldéhyde pour une concentration de substrat de 50 mM, cette concentration est plus favorable à l'oxydation de l'acétaldéhyde car bien supérieure au K_M .

Notre travail réalisé avec l'enzyme immobilisée donne des résultats inverses de ceux obtenus avec l'enzyme libre, la réponse avec l'acétaldéhyde étant alors 3 fois plus supérieure à celle obtenue avec le formaldéhyde. Comme il a été démontré par ailleurs, ceci pourrait s'expliquer par une modification de la spécificité de substrat du fait de l'immobilisation de l'enzyme.

Toutes les études réalisées avec la pFDH en solution indiquent que l'affinité et l'activité catalytique de l'enzyme diminuent avec la longueur de la chaîne carbonée de l'aldéhyde (Tableau IV.5).

Paramètres cinétiques	Formaldéhyde	Acétaldéhyde	Propionaldéhyde	n-Butyraldéhyde	Réf.
K_M (mM)	0,1	3,5	-	-	ce travail
	0,067	16			45
	0,090	5,8	47	-	46
	0,35				51
	0,25				52
	0,37				53
V_M ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	0,62	0,45	-	-	ce travail
	10				45
	5,92	1,54	0,09	-	46

Tableau.IV.5: Paramètres cinétiques (V_M et K_M) de la pFDH pour les aldéhydes

Afin de déterminer le rôle éventuel du Nafion, un biocapteur à pFDH sans membrane Nafion a été construit et testé avec les deux aldéhydes (HCHO et CH₃CHO), mais à plus faible concentration (4 mM). Comme le montre la figure IV.17, la même tendance est observée, mais la réponse obtenue pour l'acétaldéhyde est cette fois 5 fois plus importante que celle mesurée pour le formaldéhyde. L'étape d'immobilisation avec la vapeur de GA affecte donc, comme dans le cas de l'AOX et de la LODP, les propriétés catalytiques de la pFDH. Cependant, on observe dans ce cas une inversion de sélectivité que l'ajout de la membrane de Nafion semble atténuer. La valeur de K_M apparent calculée à partir des vitesses initiales de réponse du biocapteur est de 19 mM, nettement supérieure à celle mesurée ou publiée, ce qui peut aller dans le sens d'une perte d'affinité de l'enzyme pour le formaldéhyde.

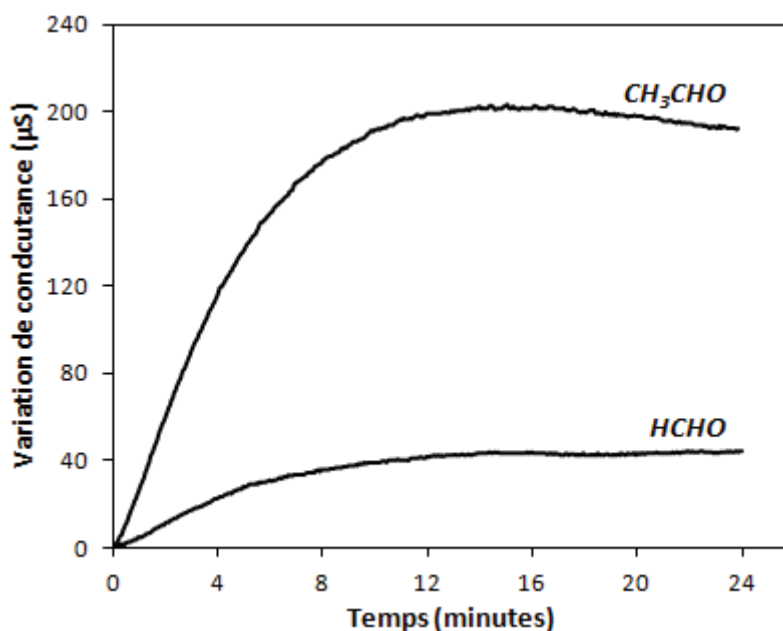


Fig.IV.17: Réponses du biocapteur à pFDH sans membrane Nafion vis-à-vis du formaldéhyde et de l'acétaldéhyde.
[Aldéhyde] = 4 mM dans tampon phosphate 5 mM pH 7

Afin de mettre en évidence d'éventuels effets de matrice, des tests de recouvrement ont ensuite été réalisés sur deux échantillons d'eau (eau du robinet et eau du Rhône) dopés à différentes concentrations en formaldéhyde et passés sur des cartouches échangeuses d'ions Chromabond afin d'échanger les ions majeurs avec des H^+ et des OH^- . Ensuite, les solutions ont été analysées par le capteur conductimétrique à base de pFDH en injectant 20 μL dans la cellule de mesure et en calculant les concentrations à partir de la courbe d'étalonnage déterminées précédemment dans le tampon phosphate. Trois mesures ont été réalisées pour chaque échantillon. Nous n'avons pu détecter de formaldéhyde dans l'échantillon non dopé tandis que d'excellents taux de recouvrement (95-110 %) ont été obtenus pour les échantillons dopés (Tableau IV.6), démontrant l'absence d'effet de matrice.

<i>Echantillon</i>	<i>Ajouté (mM)</i>	<i>Trouvé (mM)</i>	<i>Recouvrement (%)</i>
Eau du robinet	0,20	0,21	105
	0,42	0,40	95
	0,83	0,87	105
Eau du Rhône	0,19	0,21	110
	0,32	0,32	100
	0,42	0,43	102
	0,84	0,80	95

Tableau.IV.6: Analyse des échantillons d'eaux dopés avec le formaldéhyde

IV.4. Conclusion

Dans cette partie, nous avons développé un nouveau biocapteur à base de formaldéhyde déshydrogénase pour la détection conductimétrique du formaldéhyde en milieu aqueux. Quatre modes d'immobilisation ont été évalués, à savoir une réticulation de l'enzyme par des vapeurs de glutaraldéhyde, la rétention par une membrane de Nafion, une combinaison de ces deux modes, et une fixation de l'enzyme sur des nanoparticules d'or suivie de sa réticulation et de l'ajout de Nafion. Le troisième protocole s'est avéré être le plus efficace. La membrane de Nafion s'est révélée être capable de concentrer le cofacteur NAD^+ à proximité de la pFDH, induisant ainsi une augmentation significative de la concentration locale en protons, et donc une amélioration du signal conductimétrique. Dans les conditions optimales de mesure (tampon phosphate 5 mM, pH 7), le biocapteur permet de détecter jusqu'à 18 μM de formaldéhyde, correspondant à une concentration atmosphérique de 3 ppb. Le signal est linéaire jusqu'à 10 mM et s'est avéré stable pendant 12 jours lorsque le capteur a été stocké à 4°C dans du tampon phosphate 20 mM. Toutefois, on retrouve, comme pour les biocapteurs précédents, un problème d'interférence avec les aldéhydes, probablement causé par le changement de conformation de l'enzyme après immobilisation. Par contre, de très bons taux de recouvrement ont été obtenus sur des échantillons d'eau de robinet et d'eau de rivière ne contenant pas d'aldéhyde et dopés à différentes concentrations en formaldéhyde.

Références

1. G.Reuss; W.Disteldorf; A.O.Gamer; A.Hilt, Formaldehyde. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. **2000**, Wiley-VCH.
2. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), Evaluation des risques liés à l'utilisation du formaldéhyde en alimentation animale. **2004**, 25 pp. <http://www.ladocumentationfrancaise.fr/var/storage/rapports-publics/054000091/0000.pdf>. Accédé le 27/09/2013.
3. Bonnard, N.; Falcy, M.; Pasquier, E.; Protois, J.-C., Aldéhyde formique et solutions aqueuses. Fiche toxicologique INRS FT07 **2011**, 10 pp. <http://www.inrs.fr/accueil/produits/bdd/doc/fichetox.html?refINRS=FT%207>. Accédé le 27/09/2013.
4. Comité fédéral-provincial-territorial sur l'eau potable, Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada - Le Formaldéhyde. **1997 - Révisé en 2003**. http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/alt_formats/hecs-sesc/pdf/pubs/water-eau/formaldehyde/formaldehyde-fra.pdf. Accédé le 27/09/2013.
5. Duffort, G.; Houeix, N.; Manier, N.; Troise, A. Formaldehyde. INERIS-DRC-10-109974-00925A, Version N°4, **2010**, 79 pp. <http://www.ineris.fr/substances/fr/substance/getDocument/2791>. Accédé le 27/09/2013.
6. International Agency for Research on Cancer (IARC) - Formaldehyde. *IARC monograph 100F* **2006**, 401-439. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F-29.pdf>. Accédé le 27/09/2013.
7. World Health.Organization, Environmental health criteria 89 - Formaldehyde. *Geneva* **1989**. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc89.htm#SectionNumber:1.1>
8. Duong, A.; Steinmaus, C.; McHale, C. M.; Vaughan, C. P.; Zhang, L., Reproductive and developmental toxicity of formaldehyde : A systematic review. *Mutat. Res.* **2011**, 728, 118 - 138.
9. Motyka, K.; Mikuska, P., Continuous fluorescence determination of formaldehyde in air. *Anal. Chim. Acta* **2004**, 518, 51-57.
10. Liu, J.-F.; Peng, J.-F.; Chi, Y.-G.; Jiang, G.-B., Determination of formaldehyde in shiitake mushroom by ionic liquid-based liquid-phase microextraction coupled with liquid chromatography *Talanta* **2005**, 65, 705-709.

11. Barrio, M.-A.d.; Hu, J.; Zhou, P.; Cauchon, N., Simultaneous determination of formic acid and formaldehyde in pharmaceutical excipients using headspace GC/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, 41, 738-743.
12. Bianchi, F.; Careri, M.; Musci, M.; Mangia, A., Fish and Food safety : Determination of formaldehyde in 12 fish species by SPME extraction and GC-MS analysis. *Food Chem.* **2007**, 100, 1049-1053.
13. Iqbal, Z.; Novalin, S., Analysis of formose sugar and formaldehyde by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, 5116-5121.
14. Korpan, Y.I.; Gonchar, M.V.; Starodub, N.F.; Shul'ga, A.A.; Sibirny, A.A.; El'skaya, A.V., A cell biosensor specific for formaldehyde based on pH-sensitive transistors coupled to methylotrophic yeast cells with genetically adjusted metabolism. *Anal. Biochem.* **1993**, 215, 216-222.
15. Khlupova, M.; Kuznetsov, B.; Demkiv, O.; Gonchar, M.; Csoregi, E.; Shleev, S., Intact and permeabilized cells of the yeast *Hansenula polymorpha* as bioselective elements for amperometric assay of formaldehyde. *Talanta* **2007**, 71, 934-940.
16. Herschkovitz, Y.; Eshkenazi, I.; Campbell, C.E.; Rishpon, J., An electrochemical biosensor for formaldehyde. *J. Electroanal. Chem.* **2000**, 491, 182-187.
17. Kataký, R.; Bryce, M.R.; Goldenberg, L.; Hayes, S.; Nowak, A., A biosensor for monitoring formaldehyde using a new lipophilic tetrathiafulvalene-tetracyanoquinodimethane salt and a polyurethane membrane. *Talanta* **2002**, 56, 451-458.
18. Ben Ali, M.; Korpan, Y.I.; Gonchar, M.V.; El'skaya, A.V.; Maaref, M.A.; Jaffrezic-Renault N.; Martelet C., Formaldehyde assay by capacitance versus voltage and impedance measurements using bi-layer bio-recognition membrane. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, 22, 575-581.
19. Vianello, F.; Boscolo-Chio, R.; Signorini, S.; Rigo, A., On-line detection of atmospheric formaldehyde by a conductometric biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 920-925.
20. Achmann, S.; Hermann, M.; Hilbrig, F.; Jérôme, V.; Hämmerle, M.; Freitag, R.; Moos, R., Direct detection of formaldehyde in air by a novel NAD⁺- and glutathione-independent formaldehyde dehydrogenase-based biosensor. *Talanta* **2008**, 75, 786-791.
21. Demkiv, O.; Smutok, O.; Paryzhak, S.; Gayda, G.; Sultanov, Y.; Guschin, D.; Shkil, H.; Schuhmann, W.; Gonchar, M., Reagentless amperometric formaldehyde-selective biosensors based on the recombinant yeast formaldehyde dehydrogenase. *Talanta* **2008**, 76, 837-846.
22. Shimomura, T.; Itoh, T.; Sumiya, T.; Mizukami, F.; Ono, M., Electrochemical biosensor for the detection of formaldehyde based on enzyme immobilization in mesoporous silica materials. *Sens. Actuators B* **2008**, 135, 268-275.

23. Bareket, L.; Rephaeli, A.; Berkovitch, G.; Nudelman, A.; Rishpon, J., Carbon nanotubes based electrochemical biosensor for detection of formaldehyde released from a cancer cell line treated with formaldehyde-releasing anticancer prodrugs. *Bioelectrochemistry* **2010**, 77, 94-99.
24. Hämmerle, M.; Hilgert, K.; Achmann, S.; Moos, R., Direct monitoring of organic vapours with amperometric enzyme gas sensors. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, 25, 1521-1525.
25. Korpan, Y.I. Soldatkin, O. O.; Sosovska, O. F.; Klepach, H. M.; Csöregi, E.; Vocanson, F.; Jaffrezic-Renault, N.; Gonchar, M. V., Formaldehyde-sensitive conductometric sensors based on commercial and recombinant formaldehyde dehydrogenase. *Microchim. Acta* **2010**, 170, 337 - 344.
26. Korpan, Y.I., Gonchar, M.V., Sibirny, A.A., Martelet, C., El'skaya, A.V., Gibson, T.D., Soldatkin, A.P. Development of highly selective and stable potentiometric sensors for formaldehyde determination. *Biosens. Bioelectron.* **2000**, 15, 77-83.
27. Dzyadevych, S.V.; Arkhypova, V.N.; Korpan, Y.I.; El'skaya, A.V.; Soldatkin, A.P.; Jaffrezic-Renault, N.; Martelet, C., Conductometric formaldehyde sensitive biosensor with specifically adapted analytical characteristics. *Anal. Chim. Acta* **2001**, 445, 47-55.
28. Ling, Y.P.; Heng, L.Y., A potentiometric formaldehyde biosensor based on immobilization of alcohol oxidase on acryloxysuccinimide-modified acrylic microspheres. *Sensors* **2010**, 10, 9963-9981.
29. Kondo, T.; Morikawa, Y.; Hayashi, N., Purification and characterization of alcohol oxidase from *Paecilomyces variotii* isolated as a formaldehyde-resistant fungus. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, 77, 995-1002.
30. Wen, G.; Zhang, Y.; Shuang, S.; Dong, C.; Choi, M.M.F., Application of a biosensor for monitoring of ethanol. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 23, 121-129.
31. Tanaka, N.; Kusakabe, Y.; Ito, K.; Yoshimoto, T.; Nakamura, K.T., Crystal structure of formaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida*: the structural origin of the tightly bound cofactor in nicotinoprotein dehydrogenases. *J. Mol. Biol.* **2002**, 324, 519-533.
32. NurIdang, M.; Abu Bakar, F.; Salleh, A.B.; Lee, Y.H.; NorAzah, Y.; Shafiquzzaman, S., Development of electrochemical biosensor for formaldehyde determination based on immobilized enzyme. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2012**, 7, 6070-6083.
33. Paulikova, H.; Valugovh, E.; Antalík, M., Interactions between heparinoids and alcohol dehydrogenase. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1997**, 42, 667-676.
34. Paulikova, H.; Molnarova, M.; Podhradsky, D., The effect of heparin and pentosan polysulfate on the thermal stability of yeast alcohol dehydrogenase. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1998**, 46, 887-894.

35. Gallardo-Soto, A.M.; Jaffari, S.A.; Bone, S., Characterisation and optimisation of AC conductimetric biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, 16, 23-29.
36. Bolivar, J.M.; Rocha-Martin, J.; Mateo, C.; Cava, F.; Berenguer, J.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M., Coating of soluble and immobilised enzymes with ionic polymers: Full stabilization of the quaternary structure of multimeric enzymes. *Biomacromolecules* **2009**, 10, 742-747.
37. Lopez-Gallego, F.; Betancor, L; Hidalgo, A.; Dellamora-Ortiz, G.; Mateo, C.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M., Stabilization of different alcohol oxidases via immobilization and post immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, 40, 278-284.
38. Garcia-Galan, C.; Berenguer-Murcia, Á.; Fernandez-Lafuente, R.; Rodrigues, R.C., Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 2885-2904.
39. Sheldon, R.A., Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, 92, 467-477.
40. Fernandez-Lafuente, R., Stabilization of multimeric enzymes: strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme Microb Technol.* **2009**, 45, 405-418.
41. Soldatkin, A.P.; El'skaya, A.V.; Shul'ga, A.A.; Jdanova, A.S.; Dzyadevich, S.V.; Jaffrezic-Renault, N.; Martelet, C.; Clechet, P., Glucose sensitive conductometric biosensor with additional Nafion membrane: reduction of influence of buffer capacity on the sensor response and extension of its dynamic range. *Anal. Chim. Acta* **1994**, 288, 197-203.
42. Li, Y.-G.; Zhou, Y.-X.; Feng, J.-L.; Jiang, Z.-H.; Ma, L.-R., Immobilization of enzyme on screen-printed electrode by exposure to glutaraldehyde vapour for the construction of amperometric acetylcholinesterase electrodes. *Anal. Chim. Acta* **1999**, 382, 277-282.
43. Mikkelsen, S.R.; Rechnitz, G.A., Conductometric transducers for enzyme-based biosensors. *Anal. Chem.* **1989**, 61, 1737-1742.
44. Shul'ga, A.A.; Soldatkin, A.P.; El'skaya, A.V.; Dzyadevich, S.V.; Patskovsky, S.V.; Strikha, V.I., Thin-film conductometric biosensors for glucose and urea determination. *Biosens. Bioelectron.* **1994**, 9, 217-223.
45. Ando, M.; Yoshimoto, T.; Ogushi, S.; Rikitake, K.; Shibata, S.; Tsuru, D., Formaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. Purification and some properties. *J. Biochem.* **1979**, 85, 1165-1172.
46. Ogushi, S.; Ando, M.; Tsuru, D., Substrate specificity of formaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. *Agr. Biol. Chem.* **1984**, 48, 597-601.

47. Dong, S.; Dasgupta, P.K., Solubility of gaseous formaldehyde in liquid water and generation of trace standard gaseous formaldehyde. *Environ. Sci. Technol.* **1986**, 20, 637-640.
48. Román, L. d. T.-d.; Alonso-Lomillo, M. A.; Domínguez-Renedo, O.; Merino-Sánchez, C.; Merino-Amayuelas, M. P.; Arcos-Martínez, M. J., Fabrication and characterization of disposable sensors and biosensors for detection of formaldehyde. *Talanta* **2011**, 86, 324-328.
49. Kudo, H.; Suzuki, Y.; Gessei, T.; Takahashia, D.; Arakawa, T.; Mitsubayashi, K., Fiber-optic biochemical gas sensor (bio-sniffer) for sub-ppb monitoring of formaldehyde vapor. *Sens. Actuators B* **2012**, 161, 486-492.
50. Mitsubayashi, K.; Nishio, G.; Sawai, M.; Saito, T.; Kudo, H.; Saito, H.; Otsuka, K.; Noguer, T.; Marty, J.-L., A bio-sniffer stick with FALDH (formaldehyde dehydrogenase) for convenient analysis of gaseous formaldehyde. *Sens. Actuators B* **2008**, 130, 32-37.
51. Imamura, C.; Shigemori, Y., Enhancement of thermal stabilization of formaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida* by direct evolution. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2010**, 74, 1462-1465.
52. Ito, K., Takahashi, M., Yoshimoto, T.; Tsuru, D., Cloning and high-level expression of the glutathione-independent formaldehyde dehydrogenase gene from *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **1994**, 176, 2483-2491.
53. Tsuru, D.; Oda, N.; Matsuo, Y.; Ishikawa, S.; Ito, K.; Yoshimoto, T., Glutathione-independent formaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida*: survey of functional groups with special regard for cysteine residues. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1997**, 61, 1354-1357..

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au développement de biocapteurs électrochimiques à base d'enzymes de la famille des oxydoréductases : l'alcool oxydase (AOX), la lactate oxydase (LODP) et la formaldéhyde déshydrogénase (pFDH) pour la détermination, du méthanol, de l'acide lactique et du formaldéhyde, respectivement. La méthode de détection était commune aux trois capteurs (conductimétrie), de même que le type de transducteur (microélectrodes interdigitées en or) et le mode d'immobilisation des enzymes (co-réticulation à l'aide de vapeurs de glutaraldéhyde). Nous avons également étudié la combinaison à une deuxième enzyme, la peroxydase de raifort (HRP), dans le cas des deux capteurs à oxydases (AOX et LODP), et évalué l'intérêt d'ajouter une membrane supplémentaire de Nafion dans le cas du capteur à pFDH.

Nous avons montré dans cette étude l'importance du contrôle et de la maîtrise des différentes étapes de fabrication des biocapteurs, de la réception de l'enzyme à la mesure, en passant par la préparation de la solution enzymatique, sa conservation, le choix des conditions de réticulation, de conservation du biocapteur et de mesure. Tous ces paramètres jouent un rôle primordial sur les performances des outils analytiques développés, en particulier sur leur temps de réponse, leur sensibilité, leur reproductibilité, leur stabilité ou leur sélectivité.

Nous avons tout d'abord constaté que des enzymes très sensibles, comme l'AOX, pouvaient voir leur activité enzymatique diminuer de manière très sensible avant même leur immobilisation, du fait de mauvaises conditions de transport ou d'un mauvais protocole de conservation des solutions enzymatiques destinées à être déposées sur le transducteur. Ainsi, nous avons pu montrer que ces solutions devaient être divisées en plusieurs aliquotes de manière à éviter les cycles de congélation/décongélation à l'origine de l'inactivation progressive de l'enzyme. L'ajout de glycérol, agent de cryo-protection, est par ailleurs indispensable et la meilleure conservation est obtenue à -20°C. Les autres enzymes utilisées telles que la LODP et la pFDH se sont avérées plus robustes et peuvent subir plusieurs cycles de congélation/décongélation sans perte sensible d'activité.

La géométrie des microélectrodes interdigitées, le matériau qui les constitue ainsi que le substrat doivent être également convenablement choisis de manière à garantir la meilleure efficacité de détection. Dans ce travail, nous avons étudié les performances de trois transducteurs provenant du CNM (Barcelone), de l'ISPL (Ukraine) et de la société BVTT (République Tchèque), dont les géométries diffèrent soit par la longueur et le nombre de bandes, soit par la distance interdigitale et l'épaisseur des bandes, les surfaces sensibles étant respectivement d'environ 0,4 mm², 1 mm² et 9 mm². L'or a été choisi comme matériau commun pour l'élaboration de la partie sensible des trois électrodes. Nous avons montré que les transducteurs de l'IPSL (distance interdigitale et largeur des

doigts : 20 μm ; 40 doigts) conduisent aux meilleures sensibilités, en absence comme en présence de la membrane enzymatique. Les capteurs du CNM sont moins sensibles. Par ailleurs, ils ne permettent pas une bonne accroche de la membrane du fait de la nature de leur substrat (silicium), contrairement aux deux autres capteurs réalisés sur substrat céramique. Les capteurs de BVTT, de par leur forte distance interbande, présentent une faible sensibilité qu'il n'a pas été possible de compenser par des volumes de solution enzymatique plus élevés.

L'effet de la composition de la biomembrane sur la sensibilité des biocapteurs a ensuite été évalué pour chacun des trois biocapteurs. Nous avons tout d'abord observé une augmentation des signaux conductimétriques avec la quantité d'AOX ou de pFDH déposée sur les électrodes. Une teneur supérieure à 5 % en AOX entraîne cependant un décrochage de la membrane enzymatique, même lorsque la quantité de BSA ou le temps de réticulation sont augmentés, alors qu'il est possible d'augmenter la teneur en FDH jusqu'à 15 %. Le temps d'exposition optimal des enzymes à la vapeur saturée de GA est de l'ordre de 20 à 40 minutes, les valeurs les plus élevées devant être employées dans le cas des capteurs bi-enzymatiques (AOX/HRP ou LODP/HRP) ou pour les plus fortes concentrations d'enzymes. Des temps de réticulation trop faibles conduisent à la formation d'un réseau polymérique insuffisamment dense et provoquent le relargage de l'enzyme. Au contraire, des temps trop longs sont à l'origine de changements de conformation de la protéine et de son inactivation. Un réseau trop dense limite par ailleurs la diffusion et augmente le bruit de fond. L'ajout de la membrane supplémentaire de Nafion, et ceci quelle que soit son épaisseur, augmente le temps de réponse du biocapteur à FDH d'environ 10 minutes. Le même phénomène est observé lorsque la HRP est associée à l'AOX ou à la LODP. Cependant, une nette augmentation du signal est observée dans les deux cas, ce résultat pouvant être attribué soit à l'augmentation de la concentration locale en ions H^+ (cas du biocapteur à pFDH), soit à l'intervention d'une réaction enzymatique supplémentaire catalysée par la HRP et produisant des ions (cas des biocapteurs à oxydases). La proportion HRP/oxydase doit être optimisée afin de garantir la meilleure synergie entre les deux enzymes. Nous avons ainsi par exemple constaté qu'un rapport massique HRP/LODP de 1:1 conduisait à la sensibilité la plus élevée pour la détection des acides D- et L-lactiques. L'ajout de HRP avec un rapport HRP/LODP de 3 : 1 provoque une forte diminution du signal alors que celui-ci est multiplié par 2, dans les mêmes conditions, pour le biocapteur à AOX. L'ajout de nanoparticules d'or ne nous a pas permis d'améliorer les performances des biocapteurs de manière satisfaisante.

Nous avons enfin montré que les mesures conductimétriques doivent être effectuées dans une solution de tampon de faible concentration, typiquement 2 à 5 mM. Opérer à des concentrations plus faibles entraîne une diminution sensible de la répétabilité des réponses conductimétriques. A concentrations élevées, une perte importante de signal est observée. Nous avons par ailleurs constaté que le pH optimal de réponse ne coïncide pas avec le pH optimal d'activité de l'enzyme libre. L'ajout

de la membrane Nafion, chargée négativement, ou de l'enzyme HRP décale la valeur du pH optimum obtenue après simple réticulation.

Les performances des biocapteurs ont ensuite été déterminées dans les conditions optimales ainsi définies. Nous avons pu démontrer les potentialités d'application des deux biocapteurs conductimétriques à base de LODP et de pFDH pour la détection du lactate dans les produits laitiers et du formaldéhyde dans les eaux. Nous envisageons, par la suite, une application de ce dernier capteur à l'analyse d'échantillons gazeux, et de manière générale, l'intégration des microcapteurs dans des cellules à flux ou dans des systèmes microfluidiques pour des analyses en continu et/ou sur site.

Le tableau C1 compare certaines caractéristiques des biocapteurs développés dans le cas où une simple réticulation de l'enzyme est effectuée après dépôt sur le transducteur ainsi que dans les conditions de fabrication et de mesure obtenues à l'issue de l'étude d'optimisation. Nous constatons que la sensibilité des biocapteurs augmente dans l'ordre $AOX < pFDH < LODP$, quel que soit le mode d'immobilisation, en bonne corrélation avec l'ordre des valeurs de K_M apparent calculées à partir des pentes initiales des réponses des biocapteurs (tableau C2). Cet ordre est cependant différent de celui des constantes rapportées dans la littérature pour les enzymes libres ($AOX < LODP < pFDH$) et l'amélioration de sensibilité par ajout de HRP ou de Nafion varie en fonction de l'enzyme, le gain étant de 2 environ pour l'AOX et la pFDH et de 4 à 5 pour la LODP. L'amélioration des limites de détection suit celle de la sensibilité, sauf dans le cas du biocapteur à pFDH pour lequel le bruit de fond augmente du même facteur que la sensibilité par ajout de la membrane de Nafion. La valeur des constantes apparentes K_M apparent est par ailleurs plus élevée que celle des constantes de Michaelis-Menten, sauf dans le cas de la LODP où nous obtenons une valeur de K_M apparent de 0,17 mM, plus faible mais très proche de la valeur de 0,23 mM rapportée dans la littérature pour l'enzyme libre (tableau C2). Les vitesses initiales calculées à partir des réponses des biocapteurs à AOX ou pFDH suivent l'ordre des V_M mesurées sur les enzymes libres ($V_{M\ AOX} > V_{M\ pFDH}$), l'écart étant cependant plus important lorsque les enzymes sont immobilisées. Ce résultat peut s'expliquer par une limitation de la diffusion du substrat ou des ions formés liée à la présence de la membrane de Nafion. Tous ces résultats mettent donc en évidence de fortes perturbations des réactions catalysées par l'AOX, la LODP ou la pFDH suite à l'immobilisation de ces enzymes sur les électrodes. Les pertes de sélectivité observées pour chacun des biocapteurs (méthanol/éthanol dans le cas de l'AOX, D- et L-lactate pour la LOX, formaldéhyde/autres aldéhydes pour la FDH) montrent que l'étape de réticulation et/ou l'ajout d'une deuxième enzyme ou de la membrane de Nafion est à l'origine d'une modification de la conformation de la protéine, entraînant des changements au niveau du site actif. Ce changement va jusqu'à inverser la sélectivité dans le cas formaldéhyde/acétaldéhyde ou D-/L-lactate. Des interactions de type électrostatique entre la HRP, chargée globalement positivement à pH neutre, ou le Nafion,

polymère porteur de groupements sulfonates, et les trois enzymes de charge globale positive (pI dans le tableau C2), peuvent être à l'origine de ces phénomènes. La réticulation des enzymes peut également provoquer une modification sensible de leur conformation.

Ces hypothèses, ainsi que les mécanismes réellement mis en jeu (et leurs modifications éventuelles), restent néanmoins à confirmer. Il serait en particulier intéressant de réaliser des expériences supplémentaires afin de caractériser les espèces consommées ou produites et de mesurer l'activité des enzymes immobilisées à l'aide d'une autre méthode de détection (ex : spectrophotométrie). Il serait également intéressant de caractériser les interactions enzymes/HRP et enzymes/Nafion par des techniques spectroscopiques et de pouvoir les relier à certaines caractéristiques des enzymes (pI, pKa des acides aminés impliqués au niveau du site actif,...) afin de mieux pouvoir prévoir leur comportement ainsi que celui d'autres enzymes que nous pourrions envisager par la suite pour l'élaboration de nouveaux biocapteurs.

Immobilisation		Sensibilité (μ S/mM)	Limite de détection (μ M)	Saturation (mM)
Simple réticulation	AOX 5 %	1,5 (méthanol)	350	n.d.
	LODP 5 %	1160 (L-lactate) 1160 (D-lactate)	0,15 0,15	100 μ M (L-lactate) > 250 μ M (D-lactate)
	pFDH 15 %	21 (formaldéyde)	18	n.d.
Conditions optimales	AOX 5 %-HRP 15 %, réticulation	3	150	> 6 mM
	LODP 5 %-HRP 5 % , réticulation	4575 (L-lactate) 5580 (D-lactate)	0,06 0,05	> 250 μ M > 250 μ M
	pFDH 15 %, réticulation+Nafion	47 (formaldéhyde)	18	Env 200 mM

Tableau C1: comparaison de quelques performances des biocapteurs. N.d. : non déterminé

Enzyme	AOX <i>H. polymorpha</i>	LODP <i>Pediococcus sp.</i>		pFDH <i>P. putida</i>
pI	5,87	4,6		6,19
Substrat	Méthanol	L-lactate	D-lactate	Formaldéhyde
K _M enzyme libre (mM)	2,15 ^a	0,23 ^b	-	0,09 ^c
K _M apparent ^d (mM)	49,66	0,168	0,164	0,1 ^d
V _M enzyme libre ^d (μmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	1	n.d.	n.d.	0,6
V _i ^d (μmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	1130 (1 mM MeOH)	3180 (0,1 mM L-lactate)	3180 (0,1 mM L-lactate)	620 (10 mM formaldéhyde)

Tableau C2 : Valeurs des paramètres des différentes enzymes libres ou immobilisées (réticulation par des vapeurs de GA) utilisées dans ce travail. Les valeurs sont obtenues pour les enzymes seules, c'est-à-dire sans ajout de la HRP, pour les oxydases mais avec ajout de Nafion dans le cas de la pFDH. ^a Sigma Aldrich ^b Ref.15, chap III ; ^cRef.46, chap.IV. ^dCe travail

ANNEXE

Liste des publications et communications

Publications

T.T. Nguyen-Boisse, J. Saulnier, N. Jaffrezic-Renault, F. Lagarde. „Highly sensitive conductometric biosensors for total lactate, D- and L-lactate determination in dairy products, *Sens. Actuator B*, 179 (2013) 232-239.

T.T. Nguyen-Boisse, J. Saulnier, N. Jaffrezic-Renault, F. Lagarde. “Miniaturized enzymatic conductometric biosensor with Nafion membrane for the direct determination of formaldehyde in water samples”, acceptée à *Anal. Bioanal. Chem.*

Communications orales

T.-T. Nguyen, F. Lagarde, N. Jaffrezic-Renault

Influence de différentes méthodes d'immobilisation du biorécepteur (formaldéhyde déshydrogénase) sur les performances d'un biocapteur conductimétrique pour la détermination du formaldéhyde

Journée de la Société Chimique de France, section Rhône Alpes, Le Bourget du Lac, 9 juin 2011

T.T. Nguyen-Boisse, F. Lagarde, N. Jaffrezic-Renault

Assessment of Nafion polymer as immobilization matrix for formaldehyde dehydrogenase and its cofactor nicotinamide adenine dinucleotide. Application to the development of a conductometric biosensor for formaldehyde detection

EMRS, Strasbourg May 14-18, 2012

Posters

T. T. Nguyen, N. Jaffrezic-Renault, F. Lagarde, S. Dzyadevych

Construction of a new formaldehyde conductometric biosensor by co-immobilisation of formaldehyde dehydrogenase and gold nanoparticles

Workshop “Biosensors based on nanomaterials”, Kiev, 31 mai-1er juin 2010

T.T. Nguyen, F. Lagarde, N. Jaffrezic-Renault

Detection of formaldehyde in waters by a new conductometric biosensor based on NAD⁺-dependent formaldehyde dehydrogenase

MADICA 2010 (Les matériaux et leurs applications aux dispositifs capteurs), Tabarka (Tunisie), 20-22 octobre 2010.

T.-T. Nguyen, F. Lagarde, N. Jaffrezic-Renault

Détection des alcools dans les milieux aqueux par un système conductimétrique bi-enzymatique (alcool oxydase/péroxydase de raifort)

Journées Rhône-Alpes des Biomolécules, Villeurbanne, 27 mai 2011

T.-T. Nguyen-Boisse, J. Saulnier, N. Jaffrezic-Renault, F. Lagarde

Low-cost and highly sensitive L-Lactate conductometric biosensor based on interdigitated gold microelectrodes

ISE 2012, Prague, 19-24 août 2012